

metaGen Pharmaceuticals GmbH

**Identifizierung differenziell exprimierter Gene bei Brust- und
Ovarialkarzinomen in den chromosomalen Regionen
1q32-q41 und 11q12-q23**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Ruprecht Kuner

geb. am 07.01.69 in Stuttgart

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
2. Prof. Dr. André Rosenthal
3. Prof. Dr. Matthias Dürst

eingereicht: 23.01.2002

Datum der Promotion: 02.07.2002

Abstrakt:

Brust- und Ovarialkarzinome gehören zu den häufigsten sporadischen Tumorerkrankungen bei der Frau. Die Progression von benignen Neoplasien zu malignen Karzinomen werden von spezifischen Veränderungen der Genexpression begleitet. Durch die bioinformatische Auswertung von vier Millionen ESTs aus cDNA-Bibliotheken von Normalgeweben und der korrespondierenden Tumore wurden Hunderte von differenziell exprimierten Genen selektiert. Nach der chromosomalen Kartierung der Kandidatengene erfolgten weitere Untersuchungen für Gene aus den chromosomalen Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23, die häufig in Brust- und Ovarialkarzinomen als aberrant beschrieben wurden. Die Validierung der in-silico Expressionsdaten erfolgte über Northernblot- und cDNA-Array-Analysen von unselektierten und mikrodisssezierten Tumorproben. Es konnte für einige der Gene die differenzielle Expression in Brusttumoren bestätigt und dadurch neue Kandidatengene für die untersuchten Genloci identifiziert werden. Das Expressionsmuster einer Acyltransferase in 11q13 als potenzielles Tumorsuppressorgen erbrachte den Hinweis auf eine mögliche Involvierung in den Retinol-Metabolismus und könnte auf einen Mechanismus der Inhibierung der Karzinogenese im Brustepithel hindeuten.

Schlagworte:

Tumor

Brustkarzinom

Genexpression

EST

Tumorsuppressorgen

Chromosom 11

Abstract:

Breast and ovarian cancers have become major tumor diseases among woman. The progression of benign neoplasia to malignant carcinoma is characterized by specific changes of gene expression. By using an in-silico strategy to analyze four million ESTs available in cDNA libraries of normal and the corresponding tumor tissues, we selected hundreds of differentially expressed genes. After chromosomal assignment of the candidate genes, further experiments were focussed on these genes located in the specific regions 1q32-q41 and 11q13-q23 often described to be aberrant in breast and ovarian cancer specimen. The in-silico expression analysis was verified by Northern blot and cDNA-Array techniques of unselected and microdissected tumor samples. We could confirm the in-silico expression pattern of some genes and identified novel tumor associated candidate genes for the investigated loci. According to the expression pattern, an acyltransferases located in 11q13 may represent a tumor suppressor gene, which could possibly inhibit breast carcinogenesis by involving in retinol metabolism.

key words:

cancer

breast carcinoma

gene expression

EST

tumor suppressor gene

chromosome 11

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
A.1	Allgemeine Charakteristika von gynäkologischen Tumoren	1
A.1.1	Die Histopathologie des Mammakarzinoms	2
A.1.2	Die Histopathologie des Ovarialkarzinoms	4
A.2	Genetik der gynäkologischen Tumore	5
A.2.1	Genetische Ursachen des sporadischen Mammakarzinoms	6
A.2.2	Genetische Ursachen des sporadischen Ovarialkarzinoms	8
A.2.3	Charakterisierung der chromosomalen Region 1q32-q41	9
A.2.4	Charakterisierung der chromosomalen Region 11q12-q23	10
A.3	Methoden zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen	12
A.4	Zielsetzung dieser Arbeit	14
B	Material und Methoden	15
B.1	Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit	15
B.2	Bioinformatische Analysen als Grundlage dieser Arbeit	17
B.2.1	EST-Datenbanken	17
B.2.2	AUTEX und eNORTHERN	17
B.2.3	In-silico Expressionsanalyse als positionaler Ansatz für die chromosomale Region 11q12-q23	18
B.2.4	Elektronische PCR und physikalische Kartierung	19
B.2.5	Sonstige Software und Datenbanken	19
B.3	Verwendete Materialien	20
B.4	Radiation Hybrid Mapping	20
B.5	Zellkultur	22
B.5.1	Herkunft der Zelllinien	22
B.5.2	Kultivierung der Zelllinien	22
B.6	Mikrodissektion	22
B.6.1	Herkunft des Gewebes	23
B.6.2	Vorbereitung der Kryoschnitte	23
B.6.3	Durchführung der lasergestützten Mikrodissektion	24
B.7	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	25
B.7.1	Kommerzielle mRNA-Proben	25
B.7.2	Isolierung der poly(A ⁺)mRNA aus Zelllinien	25

B.7.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus mikrodisssezierten Geweben	26
B.7.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	26
B.7.5	Reverse Transkription	27
B.8	Aufarbeitungen und Bestätigung von cDNA-Klonen.....	28
B.8.1	Herkunft der cDNA-Klone für die bearbeiteten Gene	28
B.8.2	Präparation der Plasmid-DNA	29
B.8.3	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.....	31
B.8.4	Sequenzierung der cDNA-Inserts.....	32
B.9	Expressionsanalyse über Northernblot und cDNA-Arrays.....	34
B.9.1	Präparation der cDNA-Sonden.....	34
B.9.2	Kontroll-Dot Blot	35
B.9.3	Northernblot- und cDNA-Array-Hybridisierung	35
B.10	PCR-basierte Methoden und Klonierung.....	37
B.10.1	SMART-RACE-PCR.....	37
B.10.2	PCR von großen Transkripten.....	38
B.10.3	Klonierung von PCR-Fragmenten	38
B.10.4	Real-time Reverse Transkriptase-PCR (Taqman-PCR).....	39
B.10.4.1	Relative Quantifizierung.....	40
B.10.4.2	Optimierung der Primer und Sonden	41
B.10.4.3	Taqman-PCR mit experimentellen Proben	42
B.10.5	Mutationsanalyse	43
B.10.5.1	Herkunft der Brusttumor-DNA.....	44
B.10.5.2	PCR-Amplifikation von Tumor-DNA.....	44
B.10.5.3	Fluoreszenz-Markierung der PCR-Fragmente	45
B.10.5.4	SSCP-Analyse	45
B.10.5.5	Sequenzierung auffälliger Fragmente.....	46
B.11	RNA in-situ Hybridisierung	46
B.11.1	Herkunft des Paraffingewebes	47
B.11.2	Präparation der RNA-Sonden	47
B.11.3	Hybridisierung der Paraffinschnitte	48
C	Ergebnisse	50
C.1	Validierung der in-silico Expressionsanalyse	50
C.1.1	Auswertung des elektronischen Northern.....	50

C.1.2	Bestätigung der in-silico Expressionsdaten.....	51
C.2	Kartierung von 330 in-silico Kandidatengenenen für gynäkologische Tumore.....	55
C.3	Beschreibung der Kandidatengene in 11q12-q23	58
C.3.1	Validierung aller in-silico Kandidatengene in 11q12-q23.....	58
C.3.2	Charakterisierung des potenziellen Tumorsuppressorgens ELBT	63
C.3.2.1	ELBT zeigte sich in Brusttumoren signifikant geringer exprimiert	63
C.3.2.2	Bestätigung der ELBT-Expression in mikrodisssezierten Brustgeweben ..	67
C.3.2.3	Die Mutationsanalyse des Gens ELBT ergab keine genomischen Veränderungen in Brusttumoren.....	69
C.3.2.4	Expression von ELBT in Leber, Brust, Hoden und Blutleukozyten	71
C.3.2.5	Die RNA in-situ Hybridisierung zeigte die Expression von ELBT in Brustepithelzellen und in der Haut.....	73
C.3.2.6	Transkriptanalyse und genomische Struktur von ELBT	79
C.3.2.7	Das Protein ELBT ist eine putative Acyltransferase.....	81
C.4	Identifizierung von neuen Kandidatengenenen in 11q12-q23 mittels der positionalen Strategie.....	85
C.5	Beschreibung der Kandidatengene in 1q32-q41	89
C.5.1	Validierung aller in-silico Kandidatengene in 1q32-q41.....	89
C.5.2	Charakterisierung des potenziellen Onkogens PPP2R5A.....	93
C.5.2.1	Geringe Expressionsunterschiede von PPP2R5A in Brusttumoren	94
C.5.2.2	Ubiquitäre Expression von PPP2R5A in verschiedenen Geweben.....	95
C.5.2.3	RNA in-situ Hybridisierung zeigte die Expression von PPP2R5A sowohl im Tumor als auch im Normalepithel der Brust.....	96
D	Diskussion.....	100
D.1	Bewertung der in-silico Expressionsanalyse als Methode zur Identifizierung tumorassoziierter Gene	100
D.2	Bewertung der Kandidatengene in 11q12-q23 unter Einbeziehung der positionalen in-silico Expressionsanalyse	103
D.3	ELBT als potenzielles Tumorsuppressorgen im Brustepithel	108
D.4	Bewertung der Kandidatengene in 1q32-q41	111

E Zusammenfassung	115
F Referenzen	117
G Anhang	138
G.1 Häufig verwendete Lösungen und Reagenzien	138
G.2 Weitere Informationen zu den Referenzen und zu den Kandidatengenen in 11q12-q23	139
G.3 Referenzen zu Aberrationsstudien bei gynäkologischen Tumoren in Bezug auf das gesamte Genom.....	141
G.4 Nukleinsäure-und Proteinsequenz von ELBT	143
G.5 Aminosäuren	144
Abkürzungen.....	145
Danksagungen.....	147

A Einleitung

A.1 Allgemeine Charakteristika von gynäkologischen Tumoren

Die gynäkologischen Tumore der Brust, des Ovars und des Genitaltraktes gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen bei der Frau. Weltweit werden jährlich etwa 1 Mio. neue Fälle des Mammakarzinoms diagnostiziert, wobei allein in Deutschland 40.000 Frauen betroffen sind. Während sich die Heilungsaussichten beim Mammakarzinom aufgrund verbesserter Diagnostik erhöht haben, liegt die Sterberate beim Ovarialkarzinom vor allem wegen der späten Symptomatik im ersten Jahr bei über 50% (Statistisches Bundesamt 2001, Deutschland).

Die Epithelien als häufigstes Ursprungsgewebe der gynäkologischen Tumore unterliegen ständigen Veränderungen ihrer Proliferations- und Differenzierungsaktivität. Eine Deregulation dieser Vorgänge führt zur Transformation der gesunden Zelle in eine Tumorzelle. Diese Tumorzellen zeigen neue Eigenschaften wie ungehemmte Zellteilung, schwache Differenzierung, Unabhängigkeit vom Gewebeverband und Unsterblichkeit. Essentielle Signalwege für diese Eigenschaften sind der Zellzyklus und der programmierte Zelltod (Evan und Vousden, 2001). In den Tumorzellen lassen sich die genetischen Veränderungen schon an ihren Chromosomen erkennen. Es wurden sowohl Verluste als auch Vervielfältigungen der genomischen DNA in chromosomalen Regionen identifiziert, die wichtige regulatorische Gene, sogenannte Tumorsuppressorgene bzw. Onkogene beherbergen können. Aus diesen chromosomalen Aberrationen resultieren Veränderungen der Expression involvierter Gene, die für die Entstehung von Tumoren mitverantwortlich sein können.

Ein immer größer werdendes Netzwerk von Datenbanken, die exprimierte Sequenzabschnitte aus spezifischen Geweben enthalten, machen es möglich, das Expressionsmuster zwischen dem gesunden und dem Tumorgewebe zu vergleichen (Scheurle et al., 2000). Das Transkriptom zusammen mit den genomischen Sequenzdaten aus dem weltweiten humanen Genomprojekt stellen eine nützliche Grundlage dar, um neue tumorassoziierte Gene zu identifizieren. Ein Problem hinsichtlich der genetischen Charakterisierung von Tumoren ist die Heterogenität des Gewebes. Mit Hilfe verbesserter Technologien wie der lasergestützten Mikrodisektion lassen sich distinkte Areale im Tumor isolieren, die mit dem gesunden Gewebe auf molekularer Ebene verglichen werden können (Sirivatanauksorn et al. 1999). Da das Verhalten einer Zelle durch sehr komplexe Stoffwechselwege gesteuert wird, sind

wahrscheinlich auch die Ursachen für eine Entartung sehr vielfältig. Die Involvierung einzelner Gene stellen dabei nur ein Puzzlestück im gesamten Prozess der Tumorentstehung dar. Ziel muss es sein, möglichst viele assoziierte Gene und beeinflusste Signalwege in den Tumorzellen zu identifizieren, um neue effektive Angriffsmöglichkeiten für eine verbesserte Diagnose und Therapie von Krebs zu finden.

A.1.1 Die Histopathologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist der häufigste diagnostizierte Tumor bei Frauen der westlichen Länder. In den USA wurde die Anzahl der Neuerkrankungen im Jahr 2000 auf 182.800 geschätzt. Die Anzahl der Verstorbenen lag bei 40.800, womit das Mammakarzinom die häufigste Todesursache aufgrund einer Tumorerkrankung bei Frauen darstellt (Cancer Facts & Figures 2000, American Cancer Society). Die Überlebensrate ist durch die verbesserte Diagnose des Tumors im frühen Stadium in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegen. Dazu haben intensivere Vorsorgeprogramme wie die routinemäßig durchgeführte Mammographie beigetragen. Das Mammakarzinom tritt gehäuft ab dem 50. Lebensjahr auf. Statistisch signifikant ist ein verringertes Risiko im Falle einer frühen Schwangerschaft der Frau, während die Einnahme oraler Kontrazeptiva als Risikofaktor kontrovers diskutiert wird (Pathak et al., 2000).

Das Ursprungsgewebe des Mammakarzinoms ist in den meisten Fällen das Epithel, das die Milchgänge der weiblichen Brust auskleidet. Sie unterliegen ständigem hormonellen Einfluss während des monatlichen Zyklus der Frau, in der Schwangerschaft und in der Menopause. Man unterscheidet in diesem Milchgangsystem die duktaalen Anteile, die die kleineren und größeren milchabführenden Gänge (Duktuli) bilden und in die Mamille münden, von den lobulären Anteilen, die die feinen milchproduzierenden Endstrukturen (Lobuli) des Milchgangsystems darstellen (Abb.1). Die invasiven Brustkarzinome sind bezüglich ihrer klinischen und histologischen Erscheinung sehr heterogen. Bezogen auf den Ursprungsort werden beim Mammakarzinom das häufiger vorkommende invasiv duktaale Karzinom (IDC; 70-80%) und das seltenere invasiv lobuläre Karzinom (ILC; 10-20%) mit subtypisierten Varianten diagnostiziert (De Vita: Cancer, Lippincott-Raven Publishers, 5th ed, 1997). Etablierte prognostische Faktoren sind Erkrankungsalter, menopausaler Status der Patientin, histologischer Typ und TNM-Status des Tumors sowie der Östrogenrezeptor (ER)- und Progesteronrezeptor (PR) -Status. Der TNM-Status beschreibt die Charakteristika des Primärtumor (T) und die Beteiligung regionaler Lymphknoten (N) sowie entfernter Metastasen (M) bei der Erkrankung

(UICC Klassifikation; Hermanek et al., 1997). Alle genannten Faktoren erlauben die Abschätzung der längerfristigen Prognose und bestimmen das therapeutische Vorgehen wie die Operation, nachfolgende Chemo- oder Bestrahlungstherapien sowie Hormontherapie. Ein wichtiger Therapieansatz beruht auf dem Einfluss von Östrogen und Progesteron auf die Proliferation des Brustepithels. Durch Anti-Östrogene wie Tamoxifen wird die Signalübertragung auf den Östrogenrezeptor blockiert und die Entstehung von Rezidiven unterdrückt. Der Verlust der Anti-Östrogenwirkung ist für die Entstehung von Resistenzen mitverantwortlich und daher ein wichtiger prognostischer Faktor (Dahiya et al., 1998).

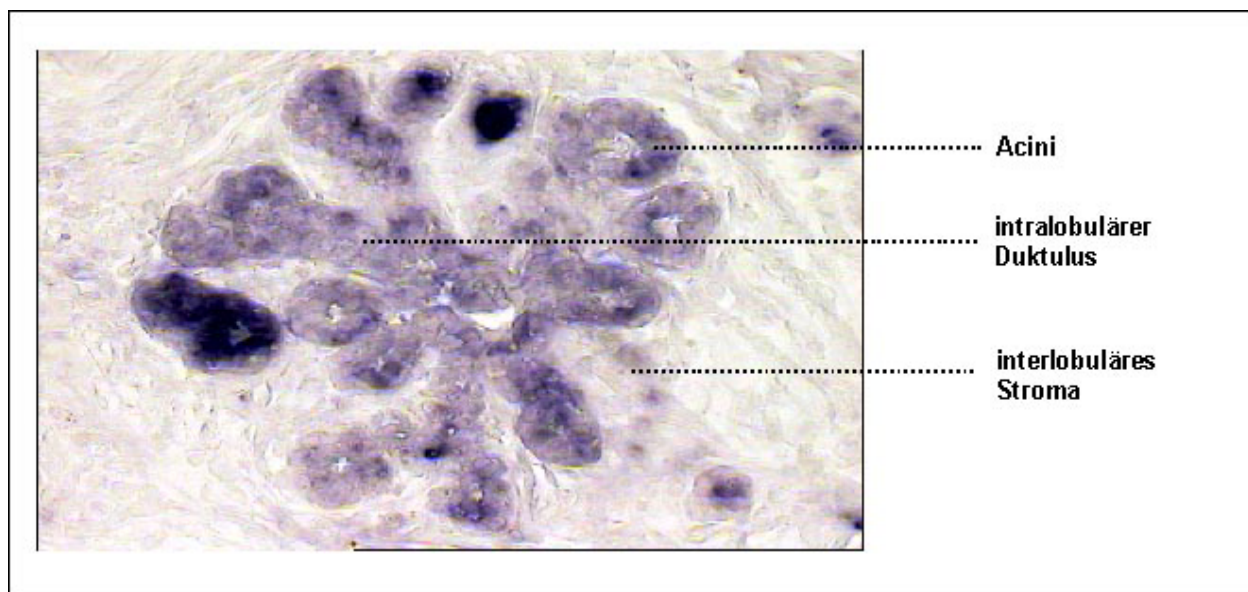


Abb. 1: Lobulus als milchproduzierende Endstruktur des Brustepithels

Die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms wird durch eine Anhäufung genetischer Veränderungen erklärt. Frühe, meist nicht diagnostizierte Veränderungen sind benigne Läsionen im Epithel, sogenannte Hyperplasien, die aufgrund einer erhöhten Proliferationsrate auffällig werden. Die malignen in-situ Karzinome werden als unmittelbare Vorstufe des gefährlichen invasiven Mammakarzinoms gesehen. Das duktales in-situ Karzinom (DCIS) konnte als Prekanzerose bei 30% der Patientinnen mit malignem Mammakarzinom diagnostiziert werden (Fonseca et al. 1997). Bei dem selteneren invasiven lobulären Karzinom ist noch unklar, ob es aus dem lobulären in-situ Karzinom (LCIS) oder de-novo entsteht (Buerger et al., 2000). Eine weitere Eigenschaft der fortschreitenden Progression und wichtiger prognostischer Faktor ist die Metastasierung. Tumorzellen gelangen aus dem Ursprungsorgan über das Lymphsystem in andere Organe und bilden dort Metastasen. Das Auftreten von lokalen

Metastasen in den axillären Lymphknoten wird bei der Entfernung des Primärtumors routinemäßig mituntersucht. Die Identifizierung von Fernmetastasen in weiteren Organen geht mit einer schlechteren Prognose einher.

A.1.2 Die Histopathologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist der zweithäufigste gynäkologische Tumor in den USA und in Europa. Die Zahl der Neuerkrankungen lag im Jahr 2000 in den USA bei 23.100 Fällen. Mit 14.000 Todesfällen im Jahr 2000 rangiert das Ovarialkarzinom an der fünften Stelle der Todesfälle aufgrund einer Tumorerkrankung. Das Risiko für ein Ovarialkarzinom steigt ab dem 40. Lebensjahr signifikant an (Cancer Facts & Figures 2000, American Cancer Society). Für die hohe Mortalitätsrate ist ein ungünstiger Verlauf dieser Karzinogenese verantwortlich. Gründe sind die Abwesenheit von Symptomen im Frühstadium, das Fehlen von diagnostizierbaren Läsionen des Ovariepithels und der Mangel an spezifischen und sensitiven Screeningverfahren. Im Falle eines detektierten Ovarialkarzinoms werden Primärtumor und mögliche vorhandene weitere Tumorherde im Intraabdominalraum entfernt und anschließend eine Strahlungs- oder Chemotherapie durchgeführt.

Das Ovarialkarzinom weist ein sehr umfangreiches histologisches Spektrum auf. Es entsteht aus dem Epithel, dem Stroma oder den Eizellen des Ovars. Die häufigen epithelialen Tumore (80-90%) werden nach der UICC Klassifikation in serös, muzinös, endometroid, Klarzell- und Brenner-Typ unterklassifiziert. Die Progression der Karzinogenese verläuft vom benignen Cystadenom über eine mögliche Zwischenstufe (Borderline-Tumor) zum malignen invasiven Karzinom. Prognostische Faktoren sind wie beim Mammakarzinom der histologische Typ des Tumors, der TNM-Status und das Alter der Frau. Als diagnostische Methoden werden die rektovaginale Untersuchung, der transvaginale Ultraschall und ein Radioimmunoassay mit dem Tumormarker CA125 durchgeführt. CA125 ist hinsichtlich einer frühen Diagnose von geringer Bedeutung, korreliert jedoch nach der Therapie bei deutlich verringertem Serumspiegel mit einer besseren Prognose für die Patientin (Mogensen et al., 1992). Die relative 5-Jahresüberlebensrate des invasiven Karzinoms von nur 50% im Vergleich zu 95% bei der Diagnose eines Borderline-Tumors unterstreicht die Notwendigkeit verbesserter diagnostischer Möglichkeiten.

A.2 Genetik der gynäkologischen Tumore

Tumorerkrankungen treten entweder in erblicher oder sporadischer Form auf. Charakteristisch für die erbliche Form ist das frühe und in einer Familie gehäufte Auftreten des Tumors. Klassisch beschrieben am Beispiel des Retinoblastom (RB), einem Tumor der Netzhaut, liegt die Mutation eines Allels des RB-Gens in der Keimbahn vor. Tritt im Laufe des Lebens im zweiten Allel eine Deletion auf, die zum Verlust der Funktion des Tumorsuppressorgens in der betroffenen Zelle führt, kommt es zur Ausprägung des Retinoblastoms (Knudsen et al., 1971). Bei den Mammakarzinomen sind etwa 5% der Tumore familiären Ursprungs (Newman et al., 1988). Im Gegensatz zu anderen erblichen Tumorerkrankungen, die auf den Ausfall eines Gens zurückzuführen sind, wurden beim familiären Mammakarzinom Keimbahnveränderungen in unterschiedlichen Genen identifiziert. Bei einem großen Teil der Patientinnen wurden gehäuft Mutationen in den beiden Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 gefunden (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1994; Blackwood et al., 1998). Mutationen des BRCA1 Gens und seltener des BRCA2 Gens sind neben dem Mammakarzinom auch mit dem Auftreten des Ovarialkarzinoms assoziiert (Frank et al., 1998). Die familiären Fälle gynäkologischer Tumore und die Involvierung identischer Gene deuten auf gemeinsame Entstehungsmechanismen hin.

Die Mehrheit der gynäkologischen Tumore (90-95%) der Brust und des Ovars treten sporadisch auf und sind durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen in den somatischen Zellen entstanden. Dabei wird hinsichtlich der Progression der Tumore von einer schrittweisen Ansammlung spezifischer genetischer Veränderungen ausgegangen, die das jeweilige Tumorstadium charakterisieren. Wie bei vielen anderen Tumoren wurden auch bei über 50% der Mamma- und Ovarialkarzinome Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 gefunden (Levine et al. 1997; Kupryjanczyk et al., 1993; Runnebaum et al., 1991). Weitere Gene, die im Zellzyklus wirken und die Proliferation der Zellen kontrollieren, zeigen in diesen Tumoren eine gesteigerte Expression. Das Onkogen MYC (Watson et al., 1993; Aunoble et al., 2000) und Cyclin D1 (Lammie et al. 1991; Barbieri et al., 1997) wirken während der G1-Phase und fördern die Zellteilung. ERBB2 reguliert als Rezeptor-Tyrosinkinase über eine Signalkaskade die Expression mitogen wirkender Gene und ist in gynäkologischen Tumoren überexprimiert (Slamon et al., 1989; Aunoble et al., 2000). Veränderungen auf DNA-Ebene können zum Verlust von Tumorsuppressorgenen führen oder die Amplifikation von Genen verursachen, die

die Tumorentstehung fördern. Die Analyse aberranter chromosomaler Regionen durch Methoden wie LOH ("Loss Of Heterozygosity"), CGH ("Comparative Genome Hybridization"), Southern Blot Analyse und Karyotypisierung stellen zusammen mit der positionalen Klonierung eine Strategie zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen dar.

A.2.1 Genetische Ursachen des sporadischen Mammakarzinoms

Um die primären genetischen Veränderungen im Verlauf der Tumorprogression zu identifizieren, werden die chromosomalen Aberrationen in den Tumoren untersucht. LOH- und CGH-Studien ergaben eine Vielzahl struktureller Aberrationen beim Mammakarzinom. In dem dargestellten Progressionsmodell wurden die chromosomalen Aberrationen hinsichtlich der Entwicklung des Tumors aus dem Mammaepithel über benigne Vorstufen zum malignen Karzinom in frühe und späte Ereignisse eingeordnet (Abb.2).

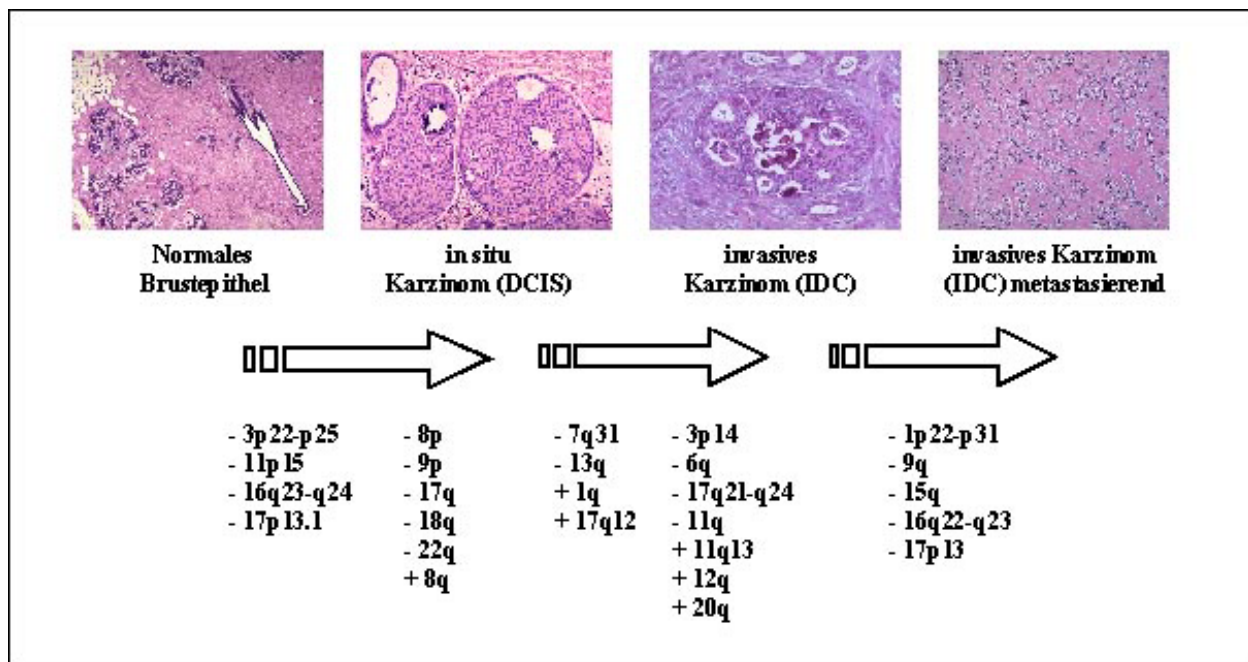


Abb. 2: Progressionsmodell des Mammakarzinoms am Beispiel des häufigsten dukalen Typs auf der Grundlage ausgewerteter Aberrationsstudien (Anhang: G3, Tab.27). Oben sind die histologisch differenzierbaren Stadien dargestellt, unten werden die Ereignisse chromosomaler Aberrationen wie Deletionen (-) und Amplifikationen (+) bestimmten Phasen der Tumorprogression zugeordnet.

Diesem Progressionsmodell liegen die Daten aus den LOH- und CGH-Studien zugrunde, die in den folgenden Erläuterungen zitiert werden einschließlich der im Anhang wiedergegebenen Referenzen (G3, Tab.27). Schon Zellen aus histologisch normalem Mammaepithel, die mit Hilfe der Mikrodisektion aus benachbarten Regionen

von Tumoren isoliert wurden wiesen Deletionen in den Regionen 3p22-p25, 17p13 und 11p15 auf (Deng et al., 1996). Untersuchungen im Stroma von Tumoren ergaben in mikrodisssezierten mesenchymalen Zellen Deletionen in 3p14, 11q21-q23, 16q23-q24 und 17q24 (Monifar et al., 2000). Die duktafen in-situ Karzinome (DCIS) zeigen zusätzlich ein sehr umfangreiches Spektrum weiterer Deletionen in 8p, 16q, 17q, 18p, 18q und 22q (Radford et al., 1995; O'Connell et al., 1998; Kittiniyom et al., 2001). Die weniger häufigen lobulären in-situ Karzinome (LCIS) weisen ähnliche Aberrationen mit Deletionen in 16p, 16q, 17p, 22q und Amplifikationen in 6q auf (Lu et al., 1998). Bei den invasiven Karzinomen wurden in groß angelegten Studien die chromosomalen Aberrationen mit der Histologie des Tumors, Eigenschaften wie dem Grading, der Metastasierung, der Rezidiventstehung und der Prognose verglichen, um so Korrelationen zwischen genetischen Veränderungen und der Progression des Tumors aufzudecken (Hirano et al., 2001; Driouch et al., 1998; Schmutzler et al., 1997). Danach zeigen sich in den Regionen 3p14, 6q24-q27, 11q22-qter und 17q21-q24 gehäuft Verluste bei den invasiven Karzinomen höheren Grades. In den Vorgang der Metastasierung scheinen Gene in den häufig deletierten Regionen 1p22-p31, 9q, 15q und 16q22-q23 involviert zu sein. Das Auftreten von Rezidiven wird mit dem Vorhandensein von Deletionen in 3p14, 3p25, 8p12-p22, 13q12-q14, 17p13.1-p13.3 und 22q12 in Verbindung gebracht.

In den jeweiligen deletierten Regionen wurden Kandidatengene identifiziert, die in Brusttumoren eine verringerte Expression auf RNA- oder Proteinebene zeigten. Bei den Tumorsuppressorgenen TP53, CDH1 und FHIT wurden in Brusttumoren, neben dem Verlust des einen Allels, Mutationen im zweiten Allel gefunden, die für einen Funktionsausfall und eine Beteiligung an der Karzinogenese sprechen (Valgardsdottir et al., 1997; Berx et al., 1998; Kannan et al., 2000). In über 60% der Brusttumore wurden Amplifikationen von DNA-Abschnitten beschrieben (Hermesen et al., 1998; Lu et al., 1998; Courjal et al., 1997). In den amplifizierten Regionen stellen MYC, ERBB2, Cyclin D1, FGFR1 und MDM2 bereits bekannte tumorassoziierte Gene dar. Die weitere Aufklärung der Abfolge von Ereignissen genetischer Veränderung während der Tumorprogression ist wichtig für das Verständnis der Tumorgenese auf molekularer Ebene und kann zur Identifizierung neuer prognostischer Marker dienen.

A.2.2 Genetische Ursachen des sporadischen Ovarialkarzinoms

Das Epithel des Ovars ist häufigster Ursprung eines Ovarialkarzinoms. Bei der Progression des Tumors unterscheidet man benigne Vorstufen wie frühe Läsionen im Epithel (Adenome) und Borderline-Tumore, die sich zum malignen Karzinom entwickeln können. Häufig wird der Tumor erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. In den verschiedenen Tumorstadien wurden eine Vielzahl chromosomaler Veränderungen identifiziert, die nach Auswertung von LOH- und CGH-Studien zu einem möglichen Progressionsmodell zusammengefasst wurden (Abb. 3).

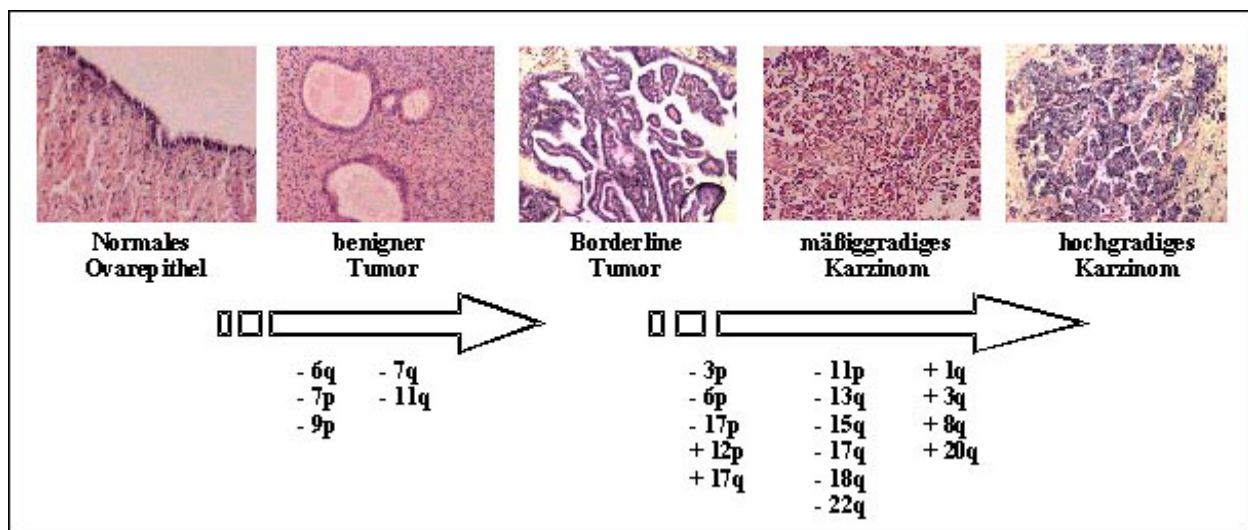


Abb. 3: Progressionsmodell des epithelialen Ovarialkarzinoms mit den histologisch differenzierbaren Stadien auf der Grundlage ausgewerteter Aberrationsstudien (Anhang G3, Tab.28). Unten angegeben die Deletionen (-) bzw. Amplifikationen (+) in entsprechenden Phasen der Tumorphysion.

In benignen Tumoren des Ovars wurden Deletionen in 6q, 7p und 9p sowie Amplifikationen von K-RAS und ERBB2 (Roy et al., 1997; Link et al., 1996) nachgewiesen. Borderline-Tumore zeigten weitere Deletionen in 7q und 11q (Watson et al., 1998). Die malignen Ovarialkarzinome werden histologisch in mäßiggradige und höhergradige Tumore unterschieden, denen als Ursache bestimmte genetische Aberrationen zugeschrieben werden. Als frühe Ereignisse wurden Deletionen in 3p, 6p und 17p neben Amplifikationen in 12p und 17q identifiziert. Spätere Ereignisse, die in den höhergradigen Ovarialkarzinomen aufgedeckt wurden, sind Deletionen in 11p, 13q, 15q, 17q, 18q und 22q neben den häufigsten Amplifikationen in 1q, 3q, 8q und 20q (Saretzki et al., 1997; Sonoda et al., 1997). Dabei wurden in einigen Regionen Kandidatengene identifiziert, die bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms eine Rolle spielen könnten. Tumore frühen Stadiums zeigten gehäuft Mutationen in TP53 und K-RAS (Link et al., 1996). Trotz der gehäuft Deletionen in 17q scheint BRCA1 wie

beim sporadischen Mammakarzinom keine wichtige Rolle bei der Entstehung des sporadischen Ovarialkarzinoms zu spielen (Futreal et al., 1994). Eine erhöhte Expression des ERBB2-Protoonkogens (17q) wurde in Vorstufen des malignen Ovarialkarzinoms gefunden, die für eine Involvierung in die frühe Karzinogenese spricht (Slamon et al., 1989). Das Kandidatengen AKT2 in der Region 19q war nach Southern Blot Analysen in 12% der untersuchten Ovarialkarzinome amplifiziert (Bellacosa et al., 1995). Im Gegensatz zum Brustkarzinom breitet sich das Ovarialkarzinom nicht nur über die Lymphgefäße aus, sondern invadiert häufig durch Ausdehnung in umliegende Organe des Peritonealraums ohne dass spezifische genetische Veränderungen hierfür bekannt sind. Innerhalb des Progressionsmodells wurden hinsichtlich einer früheren Diagnose und verbesserter Mortalitätsraten noch keine adäquaten Tumormarker evaluiert.

A.2.3 Charakterisierung der chromosomalen Region 1q32-q41

Die in dieser Arbeit näher untersuchte chromosomale Region 1q wird in CGH-Studien von Brust- und Ovarialkarzinomen häufig als amplifiziert beschrieben. Dabei zeigten sich in 40-75% der Brusttumore und 40% der Ovarialtumore Amplifikationen in 1q32-q41 (Tirkkonen et al., 1998; Benitez et al., 1997; Tapper et al., 1997; Sonoda et al., 1997). Mögliche Kandidatengene werden im Zusammenhang mit dem 1q32-Amplikon in verschiedenen Tumoren diskutiert. In einer CGH-Studie über squamöse Zellkarzinome des Ösophagus wurde die 1q-Amplifikation mittels FISH auf einen minimalen Bereich kartiert und der Transkriptionsfaktor ATF3 und das Zentromerprotein CENPF als amplifiziert identifiziert (Pimkhaokham et al., 2000). Das Gen für einen weiteren Transkriptionsfaktor ELF3 wurde in die Region 1q32 kartiert und zeigte sich im Lungenkarzinom, im Adenokarzinom und in verschiedenen Tumorzelllinien epithelialen Ursprungs überexprimiert (Tymms et al., 1997). Das epithelspezifisch exprimierte Gen ELF3 wurde mit der Regulation von Genen assoziiert, die bei späten Differenzierungsvorgängen eine Rolle spielen (Oettgen et al., 1999; Brembeck et al., 2000). Eine induzierte Überexpression von ELF3 in der Brusttumor-Zelllinie Hs578t zeigt eine Aktivierung des TGF-beta-Signalweges (Chang et al., 2000). Weitere tumorassoziierte Gene liegen in einem Gencluster in 1q32, dessen Mitglieder das Komplementsystem regulieren. Die Glykoproteine CD46/MCP und CD55/DAF inhibieren dabei das Komplementsystem über die C3-Konvertase. Die Tumorzellen könnten sich im Falle einer Überexpression der komplement-gekoppelten

Immunantwort entziehen, wie am Beispiel des zervikalen Karzinoms gezeigt wurde (Simpson et al., 1997). Das Protein DAF besitzt zudem eine Bindungsstelle für CD97, einem Marker für Differenzierungsvorgänge und Lymphknoten-Involvierung beim Schilddrüsentumor (Hamann et al., 1998). Für Brust- und Ovarialkarzinome wurden validierte Onkogene innerhalb der Region 1q32-q41 bislang nicht beschrieben.

A.2.4 Charakterisierung der chromosomalen Region 11q12-q23

Die chromosomale Region 11q12-q23 wurde aufgrund der vielen Hinweise auf die Lokalisation tumorassoziierter Gene hinsichtlich der Entstehung von Brust- und Ovarialtumoren ausgewählt. Zahlreiche LOH- und CGH-Studien über Brusttumore beschreiben innerhalb 11q12-q23 Hot-Spot-Regionen, die gehäuft Amplifikationen und Deletionen zeigen (Tab.1). Dabei wurden in der Vergangenheit für einige der aberranten Regionen Gene identifiziert, die in der Entstehung dieser Tumore involviert sind. Proximal ist die Region 11q13 in vielen soliden Tumoren, als auch in Zelllinien häufig amplifiziert (Forozan et al., 1999). Das gut charakterisierte Gen Cyclin D1 (CCND1) und die weiter distal gelegenen Gene FGF4/HSTF1, FGF3/INT-2 und EMS1/Cortactin werden zum 11q13 Amplikon zusammengefasst, das in etwa 15% der soliden Brusttumore amplifiziert ist (Dickson et al., 1995; Schuurin, 1995). Dabei zeigten sich in einem großen Anteil der Tumore Koamplifikationen von CCND1, FGF3 und FGF4 (Borg et al., 1991; Karlseder et al., 1994), wobei auch unabhängige Amplifikationen von EMS1 in 7% der Tumore beschrieben wurden (Hui et al., 1997). In Ovarialkarzinomen korrelierte der Grad der Transformation mit einer übermäßigen Expression von FGF4, FGF3 und CCND1 (Schmitt et al., 1996; Barbieri et al., 1997). Eine weitere amplifizierte Region wurde weiter distal in 11q13.5-q14 einschließlich dem Kandidatengen GARP beschrieben, das in 12% der untersuchten Brusttumore amplifiziert war (Karlseder et al., 1994; Szepetowski et al. 1992b).

Neben den beschriebenen Amplifikationen konnte in der Region 11q13 auch LOH in 23-67% der untersuchten Brusttumore nachwiesen werden (Gudmundsson et al., 1995; Zhuang et al., 1995). In dieser Region wurde das potenzielle Tumorsuppressorgen BRMS1 identifiziert, das nach Transfektion in der Brusttumor-Zelllinie MDA-MB-231 die Metastasierung hemmt (Seraj et al., 2000). Als schon bekanntes tumorassoziertes Gen in 11q13 ist MEN1 mit einem familiären Syndrom multipler endokriner Neoplasien Typ 1 assoziiert, wobei keine Korrelation zu gynäkologischen Tumoren nachgewiesen wurde. In zahlreichen Studien wurden mittels unterschiedlicher STS-Marker innerhalb der

Region 11q14.1-q23.3 gehäuft LOH in Brusttumoren beschrieben. Dabei ergaben sich eine Reihe von auffälligen Loci, in denen Tumorsuppressorgene vermutet jedoch noch nicht identifiziert wurden. Proximal in 11q22.1 konnte in etwa 40% der untersuchten Brusttumore LOH nachgewiesen werden (Koreth et al., 1997 ; Negrini et al., 1995).

Tab. 1: Die LOH- und Amplifikationsstudien bei Brusttumoren in der chromosomalen Region 11q12-q23 sind durch die deletierten (LOH) oder amplifizierten (Amp) Loci, die Häufigkeit der Aberration und der Fallzahlen aufgelistet. Die verschlüsselten Literaturstellen sind im Anhang (G.2, Tab.25) wiedergegeben.

Gen / STS-Marker	Lokalisation	Aberration	Studien mit primären Brustkarzinomen		
			Ratio	Fallzahlen	Referenzen
GSTP1	11q13.4	Amp	5%	13 / 239	1
D11S97	11q13.4	Amp	17%	86 / 514	1, 2
Cyclin D1	11q13.4	Amp	15%	373 / 2451	1 – 8
CCND1 / FGF3		Amp	16%	317 / 1993	9 – 12
FGF4	11q13.4	Amp	14%	231 / 1632	1, 4, 8, 13 – 16
FGF4 / FGF3		Amp	17%	49 / 292	17
FGF3	11q13.4	Amp	14%	447 / 3311	1, 4 - 8, 13, 15, 16, 18 – 25
FGF3		LOH	22%	32 / 143	23, 26, 27
Amplaxin	11q13.4	Amp	11%	146 / 1350	1, 12
SEA	11q13.4	Amp	3%	7 / 239	1
GARP	11q13.5	Amp	12%	66 / 544	1, 7
D11S527	11q13.5	LOH	25%	26 / 103	27
D11S901	11q14.1	LOH	30%	16 / 54	28, 29
D11S4175	11q14.3	LOH	34%	24 / 70	30
D11S1342	11q14.3	LOH	40%	4 / 10	31
D11S873	11q14.3	LOH	46%	5 / 11	29
D11S29	11q13.4	LOH	38%	60 / 160	31, 32
D11S35	11q22.1	LOH	39%	64 / 165	26, 27, 28, 31
D11S940	11q22.1	LOH	31%	11 / 36	31
D11S2000	11q22.3	LOH	43%	3 / 7	31
D11S1325	11q22.3	LOH	33%	30 / 91	33
D11S1778	11q22.3	LOH	37%	294 / 791	33, 34
D11S1294	11q22.3	LOH	43%	258 / 607	33, 34
D11S2179 / D11S1294	11q22.3	LOH	25%	8 / 32	35
D11S2179	11q22.3	LOH	37%	47 / 127	33
D11S927	11q22.3	LOH	39%	185 / 472	27, 33, 34
D11S1391	11q23.1	LOH	37%	38 / 97	36, 37
D11S1347	11q23.1	LOH	37%	46 / 123	33
D11S897	11q23.1	LOH	36%	9 / 25	29, 31
D11S528	11q23.2	LOH	38%	16 / 42	26, 31
D11S1340	11q23.3	LOH	60%	5 / 8	31
APOC3	11q23.3	LOH	44%	231 / 529	28, 33, 38, 39
D11S976	11q23.3	LOH	24%	43 / 182	32
CD3D antigen	11q23.3	LOH	27%	15 / 56	29, 31
D11S924	11q23.3	LOH	60%	3 / 5	31
D11S925	11q23.3	LOH	31%	27 / 87	27

Die Feinkartierung der LOH-Region 11q23 ergab zwei unterschiedliche Loci in 11q23.1 und 11q23.3, die in 30-40% der Brusttumore deletiert waren (Monaco et al., 1997; Di Iasio et al., 1999; Laake et al., 1999). In der Region 11q23.1 sind die tumor-assoziierten Gene ATM und PPP2R1B lokalisiert, für die sowohl Deletionen als auch Mutationen in verschiedenen Neoplasien beschrieben wurden (Gatti et al., 1999;

Wang et al., 1998). Für das Gen ATM ergab sich ein Hinweis auf die Involvierung in die Entstehung familiärer Brusttumore (Easton, 1994). Weitere Gene in 11q23 wie LOH11CR2A und ZNF202 wurden als mögliche Kandidatengene in den LOH-Regionen diskutiert, konnten über eine Mutationsanalyse aber nicht bestätigt werden (Monaco et al., 1997, 1998). Im Gen HSC70 (Heat Shock Cognate 70) wurden in zwei von 15 sporadischen Brusttumoren Mutationen gefunden, die auf einen Einfluss des Gens in die Karzinogenese einer kleinen Fraktion von Tumoren schließen lassen (Bakkenist et al., 1999). Die weniger zahlreichen LOH-Studien von Ovarialkarzinomen ergaben ähnliche Hot-Spot-Regionen in 11q22.1 und 11q23 mit Deletionen in 30-50% der untersuchten Tumore, ohne dass Kandidatengenen beschrieben wurden (Gabra et al., 1995; Davis et al., 1996; Launonen et al., 1998).

A.3 Methoden zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen

Die chromosomalen Aberrationen bei den gynäkologischen Tumoren der Brust und des Ovars sind Grundlage für die Strategie der positionalen Klonierung von tumorassoziierten Genen. Dabei wird klassischerweise mittels physikalischer und genetischer Karten die genaue Position des Genlocus bestimmt. Mittlerweile können über den wesentlich schnelleren Ansatz des positionellen Kandidatengenverfahrens genomische Sequenzdatenbanken des humanen Genomprojekts (HUGO) genutzt werden, um spezifische chromosomale Regionen auf mögliche Kandidatengenen zu untersuchen (Sanseau, 2001). Unter der Annahme, dass Verhalten und Funktion einer Zelle von ihrem Transkriptom bestimmt werden und die Zusammensetzung an Proteinen mit dem Vorhandensein der RNA-Moleküle korreliert, können Expressionsanalysen zur Identifizierung von Kandidatengenen sehr nützlich sein. Es sind verschiedene Methoden entwickelt worden differenziell exprimierte Gene zu identifizieren. Beim "Differential Display" werden die 3'-Enden der mRNAs aus Tumorgewebe und entsprechenden Normalgewebe revers transkribiert, mit Hilfe der PCR amplifiziert und nebeneinander auf einem denaturierenden Sequenzgel aufgetrennt. Dabei lassen sich differenzielle Banden identifizieren, die cDNA eluieren und klonieren (Liang und Pardee, 1992). Eine ähnliche Methode der Identifizierung differenziell exprimierter Gene stellt die subtraktive Hybridisierung dar (Diatchenko et al., 1996). Grundlage für beide Methoden ist die Isolierung qualitativ hochwertiger mRNA aus den zu untersuchenden Geweben. Der notwendige Schritt der PCR-Amplifikation zur Gewinnung ausreichender cDNA-Mengen ist mit dem Risiko falsch positiver Fragmente verbunden. Die beiden

genannten Methoden sind sehr aufwendig in ihrer Durchführung und benötigen große Mengen an RNA, deren Beschaffung im Falle von menschlichem Normalgewebe für den Vergleich mit Tumorgewebe sehr schwierig ist.

Die Identifizierung tumorassoziierter Gene aufgrund ihrer differentiellen Expression ist auch ohne aufwendige labortechnische Methoden durchführbar. Neben den genomischen Sequenzdatenbanken stehen sogenannte EST- ("Expressed Sequence Tag") Bibliotheken zur Verfügung, die in Verbindung mit bioinformatischen Programmen eine nützliche Quelle zur Identifizierung von tumorassozierten Kandidatengenen darstellen (Zhang et al., 1997). EST-Bibliotheken repräsentieren gewebespezifische Sequenzabschnitte exprimierter Gene, die über RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, Klonierung und Sequenzierung erzeugt wurden. Es wird geschätzt, dass je nach Zelltyp zwischen 10.000 und 30.000 verschiedene Gene mit einer durchschnittlichen Gesamtzahl von 300.000 mRNA-Molekülen pro Zelle exprimiert werden. Eine erzeugte EST-Bibliothek enthält zwischen 1.000 und 10.000 ESTs und repräsentiert daher nur ein Bruchteil der mRNAs von exprimierten Genen (Vingron et al., 1999). In einer Arbeit wurden 1.5 Millionen ESTs verfügbar in CGAP- ("Cancer Gene Anatomy Project") Bibliotheken genutzt, um mittels "digitalem Differential Display" über 600 differentiell exprimierte Gensequenzen in soliden Tumoren zu identifizieren (Scheurle et al., 2000).

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit war ein ähnlicher bioinformatischer Ansatz zur Identifizierung potenzieller tumorassoziierter Gene (Schmitt et al., 1999). Dabei wurden öffentliche (CGAP) und private (Incyte Pharmaceutical, Palo Alto, CA, USA) EST-Datenbanken mit insgesamt über 4 Mio ESTs aus unterschiedlichen Geweben und korrespondierenden Tumoren genutzt, um über eine in-silico Expressionsanalyse differenzielle Gene zu identifizieren. Im Gegensatz zur Studie von Scheurle et al. erfolgte die Assemblierung der ESTs aus den cDNA-Bibliotheken zu putativen Genen. Die differenzielle Expression der Gene wurde anschließend über die Herkunft der zugehörigen ESTs aus den Normalgewebe- oder korrespondierenden Tumorgewebe-Bibliotheken bestimmt. Der bioinformatische Ansatz der Kandidatengensuche über EST-Datenbanken stellt eine Methode zur schnellen Identifizierung von differenziell exprimierten Genen dar, die als Grundlage für weiterführende experimentelle Studien dienen.

A.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Validierung von Genen, die in die Entstehung bzw. Progression von Brust- und Ovarialkarzinomen involviert sind und in den häufig aberranten Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23 lokalisiert sind. Die Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten Teil wurden EST-Datenbanken verschiedener Gewebe und korrespondierender Tumore bioinformatisch ausgewertet, um differenziell exprimierte Gene zu selektieren. In diesem genomweiten Ansatz wurden 330, in gynäkologischen Tumoren differenziell exprimierten Kandidatengenen (Dahl et al., 1999; Abstract) chromosomal kartiert, wobei der Fokus dieser Arbeit auf Kandidatengene für sporadische Brust- und Ovarialkarzinome gelegt wurde. Auf dieser Grundlage wurden die kartierten Kandidatengene mit den beschriebenen chromosomalen Aberrationen in gynäkologischen Tumoren verglichen. Aufgrund der in Brust- und Ovarialkarzinomen häufig nachgewiesenen Deletionen und Amplifikationen für die chromosomalen Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23 wurden die dort lokalisierten in-silico Kandidatengene für diese Arbeit ausgewählt und weiter untersucht. Die in-silico differenzielle Expression dieser Gene sollte durch weitere Expressionsexperimente bestätigt werden, um tumorassoziierte Gene in diesen Regionen zu identifizieren. Zum anderen wurden die humanen annotierten Genomsequenzen genutzt, um die Kandidatengene genomisch zu charakterisieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein positionaler Ansatz der in-silico Kandidatengensuche für die Region 11q12-q23 durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl von Studien, die chromosomale Aberrationen in dieser Region für Brusttumore beschreiben und der geringen Zahl von bereits identifizierten Kandidatengenen war es ein Ziel, diese Region systematisch auf weitere tumorassoziierte Gene zu untersuchen. Mit Hilfe der aktuellen genomischen Sequenzdatenbank konnte die chromosomale Region für deletierte und amplifizierte Loci physikalisch neu kartiert und mit den differenziell exprimierten Kandidatengenen verglichen werden.

Die Vorgehensweise für die Kandidatengensuche in dieser Arbeit kombiniert die in-silico Expressionsanalyse mit der Validierung differenziell exprimierter Gene unter Berücksichtigung beschriebener tumorassoziiierter Genloci in 1q32-q41 und 11q12-q23.

B Material und Methoden

B.1 Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit

Grundlage für die Arbeit war die in-silico Expressionsanalyse von putativen Genen mit Hilfe der in der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH etablierten bioinformatischen Programme AUTEX und eNORTHERN (Schmitt et al., 1999). Die identifizierten, in-silico differenziell exprimierten Gene wurden anschließend über elektronische PCR oder mittels des "Radiation Hybrid Panel" chromosomal kartiert. Die Kartierung von 330 in-silico differenziell exprimierten Kandidatengene für gynäkologische Tumore war die Basis für die weitere Arbeit (Dahl et al., 1999; Abstract). Über den Vergleich von beschriebenen chromosomalen Aberrationen in Brust- und Ovarialkarzinomen wurden die in-silico Kandidatengene aus den Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23 zur weiteren Charakterisierung für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Ein erstes Ziel war es, die in-silico Expressionsdaten der Gene experimentell zu bestätigen und den Nutzen des bioinformatischen Ansatzes zur Kandidatengensuche zu überprüfen. Dabei wurden Northernblot- und cDNA-Array-Analysen von Normal- und Tumorgeweben durchgeführt, um die differenzielle Expression in den gynäkologischen Tumoren zu bestätigen. Zur weiteren Charakterisierung der Gene wurden Annotationen auf cDNA- und genomischer Ebene durchgeführt. Bei unbekannten Genen wurde durch Sequenzierung von cDNA-Klonen versucht, das cDNA-Assembly zu bestätigen und, falls erforderlich, fehlende 5'-Enden über RACE-PCR zu identifizieren. Nach der Interpretation der bioinformatischen Daten zusammen mit den ersten Expressionsdaten wurden die Gene weiterbearbeitet, deren Tumorassoziation bestätigt werden konnte. Es erfolgte eine weitere Charakterisierung dieser Gene durch Expressionsexperimente wie RNA in-situ Hybridisierung an Tumorschnitten und Taqman-Analysen von mikrodisssezierten Brusttumoren. Bei dem potenziellen Tumorsuppressorgen ELBT wurde eine Mutationsanalyse in Brusttumoren durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein weiterer bioinformatischer Ansatz gewählt, um speziell die Region 11q12-q23 systematisch auf weitere Kandidatengene für Brustkarzinome zu untersuchen. Alle identifizierten, in-silico differenziell exprimierten Gene wurden zusammen mit den beschriebenen LOH- und Amplifikations-Loci physikalischen neu kartiert, wobei die aktuelle annotierte genomische Sequenzdatenbank verwendet wurde. Der Vergleich der in-silico Kandidatengene mit den aberranten Loci sollte zum einen Aufschluss über neue tumorassoziierte Gene in der

Region 11q12-q23 geben, zum anderen die im ersten Teil der Arbeit untersuchten Gene als potenzielle Onkogene und Tumorsuppressorgene für schon beschriebene Loci eingrenzen (Abb.4).

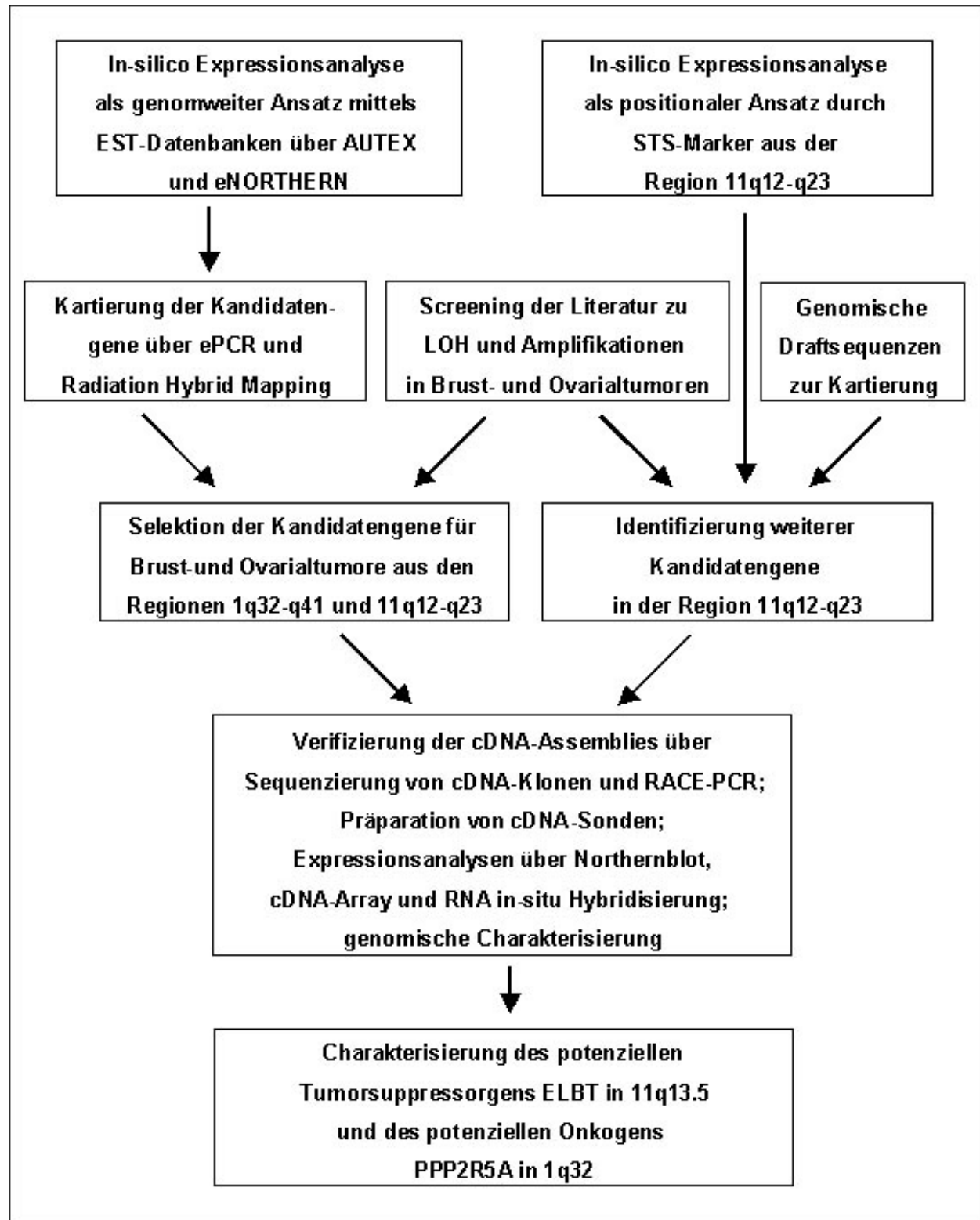


Abb.4: Fließdiagramm über die Vorgehensweise in dieser Arbeit.

B.2 Bioinformatische Analysen als Grundlage dieser Arbeit

B.2.1 EST-Datenbanken

Für die in-silico Kandidatengensuche standen neben der Nutzung der öffentlichen cDNA-Datenbanken (CGAP, National Cancer Institute) auch ein Zugang zu den privaten cDNA-Bibliotheken der Firma Incyte Pharmaceuticals (Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung. Insgesamt gingen vier Millionen ESTs aus 23 verschiedenen Geweben und korrespondierenden Tumoren in die Analyse ein. Um für die in-silico Expressionsanalyse eine repräsentative EST-Anzahl für ein spezifisches Normalgewebe, beziehungsweise Tumorgewebe zu gewährleisten, wurden die ESTs der cDNA-Bibliotheken eines Gewebetyps gepoolt. Dabei wurden ausschließlich nicht-normalisierte cDNA-Bibliotheken verwendet, um die absoluten EST-Zahlen der Gewebe für die in-silico Expressionsanalyse aufrechtzuerhalten.

B.2.2 AUTEX und eNORTHERN

Der bioinformatische Ansatz (Schmitt et al., 1999) lässt sich in zwei Schritte unterteilen (Abb. 5). Im ersten Schritt wurde ein nicht-redundantes Set an Start-ESTs generiert und mittels aller verfügbaren ESTs aus den Bibliotheken über das Programm AUTEX ("Automatic Extension of partial DNA Sequences") zu maximal langen Sequenzabschnitten (Contigs) verlängert. In diesem automatischen, iterativen Suchverfahren wurden alle ESTs eingesammelt, die aufgrund Sequenzidentitäten mit dem Start-EST überlappen. Für die Assemblierung der einzelnen ESTs wurde das Programm GAP ("Genome Assembly Program", Bonfield et al., 1995) genutzt. In der ersten Runde von AUTEX wurde eine Fehlerrate von nur 2% zugelassen, um eine möglichst gesicherte Anfangssequenz zu erhalten, mit der in den folgenden AUTEX-Runden weitere ESTs mit 5% Fehlerrate gesucht wurden. Die zugelassene Fehlerrate begründet sich durch Sequenzierfehler überwiegend am 3' Ende der ESTs. Die Annotation der Sequenzen von den in-silico differenziell exprimierten Genen und daraus resultierenden Proteinen erfolgte über das geläufige BLAST-Programm gegen nicht-redundante Nukleotid- und Proteinsequenzen (Altschul et al., 1990). Im zweiten Schritt wurde auf der Basis der generierten Assemblies eine in-silico Expressionsanalyse durchgeführt. Das Programm eNORTHERN (elektronischer Northern) basiert auf ein Suchprogramm, das alle eingesammelten ESTs eines putativen Gens entsprechend ihrer Herkunft aus den gewebespezifischen Bibliotheken anordnet. Die differenzielle Expression zwischen dem Normalgewebe und dem korrespondierendem Tumor ergibt sich über die Anzahl der

ESTs zu einem Gen in den jeweiligen Geweben unter Berücksichtigung der Bibliotheksgrößen. Dabei wurde die Signifikanz der differentiellen Expression mittels dem Fisher Exact Test (Fisher et al., 1973) statistisch ausgewertet und eine Signifikanzschwelle (P-Wert $\alpha < 0,1$) definiert. Das Verhältnis Tumor zu Normalgewebe (T/N) gibt Aufschluss darüber, ob das Gen im Tumor stärker ($T/N > 1$) oder schwächer ($T/N < 1$) exprimiert wird und zeigt die Intensität der differentiellen Expression an (Schmitt et al., 1999).

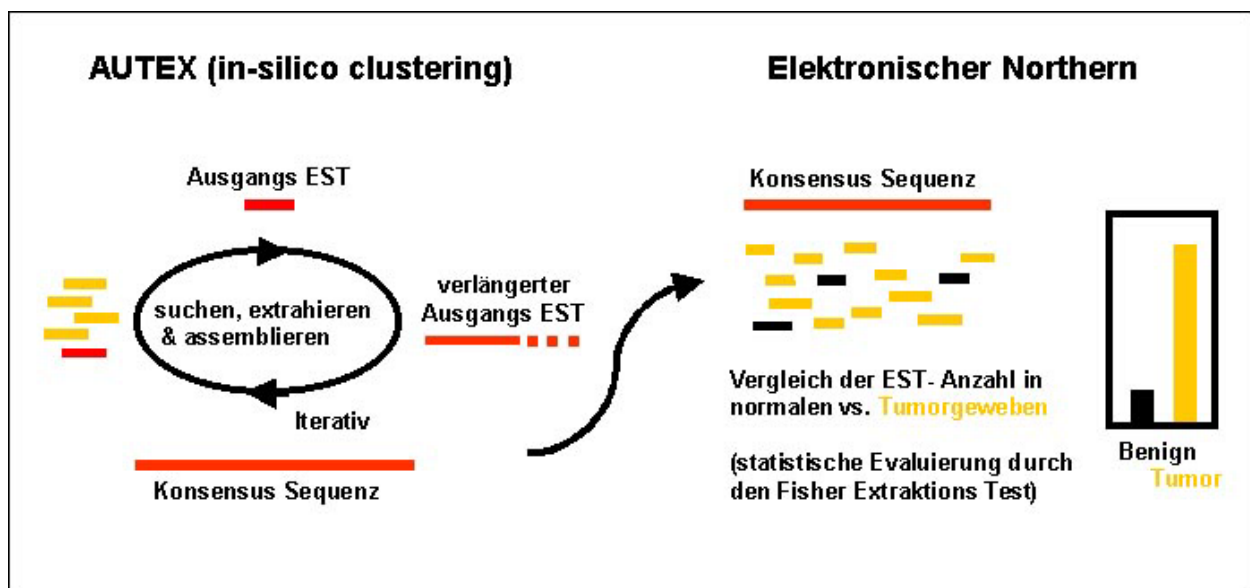


Abb.5: Darstellung der in-silico Expressionsanalyse mittels der bioinformatischen Programme AUTEX und eNORTHERN (Schmitt et al., 1999).

B.2.3 In-silico Expressionsanalyse als positionaler Ansatz für die chromosomale Region 11q12-q23

Neben dem genomweiten Ansatz der Identifizierung von tumorassoziierten Genen wurde für die Region 11q12-q23 eine positionale Strategie gewählt, um weitere Kandidatengene in dieser Region zu identifizieren. Es wurden für die in-silico Expressionsanalyse von Transkripten in der Region 11q12-q23 alle zur Verfügung stehenden 968 STS-Markern zwischen dem proximalen Marker RH13699 in 11q12 und dem distalen Marker RH27416 in 11q23 aus GeneMap '99 (NCBI, Stand Juni 2000) ausgewählt und über AUTEX verlängert. Durch ein "jeder-gegen-jeden-BLASTN" wurde ein nicht-redundantes Set von putativen Genen aus 11q12-q23 generiert und über den elektronischen Northern analysiert. Anschließend wurden die Gene selektiert, die in Brustkarzinomen gegenüber den Normalgeweben in-silico differentiell exprimiert waren.

B.2.4 Elektronische PCR und physikalische Kartierung

Die chromosomale Kartierung der Kandidatengene wurde primär über eine Datenbankabfrage, die ePCR (elektronische PCR) durchgeführt. Bei der ePCR erfolgt ein Vergleich der zu analysierende Sequenz gegen die STS ("Sequence Tagged Site")-Datenbank (Schuler et al., 1998). Im Falle eines positiven Ergebnisses werden die STS-Marker wiedergegeben, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Suchsequenz lokalisiert sind. Die chromosomale Position des Kandidatengens kann über die angegebenen STS-Marker bestimmt werden, die in genetischen und physikalischen Karten (Genome Database, GDB; Human Genome Draft, NCBI) angeordnet sind und abgefragt werden können. Je nach Genauigkeit der Kartierung des STS-Markers kann die unbekannte Sequenz einem chromosomalen Abschnitt unterschiedlicher Ausdehnung zugeordnet werden.

Die in-silico differenziell exprimierten Gene des positionalen Ansatzes aus 11q12-q23 wurden zusammen mit den beschriebenen LOH- und Amplifikations-Loci physikalisch kartiert, wobei die annotierte genomische Sequenzdatenbank der Universität von Kalifornien in Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>; Stand Juni 2001) verwendet wurde. Zuerst erfolgte ein Vergleich der zu analysierenden Sequenzen gegen die genomische Datenbank (HTGS), um zu ermitteln, auf welchen BAC-Klonen die Gen oder die STS-Marker lokalisiert sind. Die physikalische Position der Gene und STS-Marker richtete sich nach der Ausdehnung der getroffenen, annotierten BAC-Sequenzen im humanen Genom.

B.2.5 Sonstige Software und Datenbanken

• BLAST, PSIBLAST	• Altschul et al., 1990
• CHROMA (alignment software)	• Goodstadt et al., 2001
• ClustalX (multiple sequence alignment)	• Jeanmougin et al., 1998
• gap4 (global alignment program)	• MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge
• gde (genetic data environment), reap, scope	• Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena
• GeneScan™ 672	• PE Applied Biosystems, Weiterstadt
• HTGS (High Throughput Genomic Sequences)	• National Center of Biotechnology Information (NCBI)
• ImageQuaNT	• Molecular Dynamics, Krefeld
• Primer3	• Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston
• RepeatMasker	• University of Washington
• TMHMM 2.0	• Krogh et al., 2001

B.3 Verwendete Materialien

Die Materialien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen, sofern in den Beschreibungen der Methoden nicht anders angegeben. Häufig verwendete Reagenzien und Lösungen sind im Anhang (G.1) aufgeführt.

B.4 Radiation Hybrid Mapping

Die Kandidatengene, bei denen die Datenbankabfrage der elektronischen PCR zu keinem Ergebnis führte, wurden über die Methode des "Radiation Hybrid Mapping" chromosomal kartiert (Cox et al., 1990). Das in dieser Arbeit verwendete Stanford G3 Radiation Hybrid Panel (RH01; Research Genetics, Inc, AL, USA) besteht aus 83 Hamster-Mensch-Hybrid DNA-Proben. Die somatischen Hybridklone entstanden durch Bestrahlung einer humanen lymphoblastoiden Donor-Zelllinie (RM), die anschließend mit Thymidin-defizienten Hamsterzellen fusioniert wurden. Die humanen Chromosomenbruchstücke integrierten in die Hamsterchromosomen und wurden zu den 83 stabilen Hybridklonen selektiert. Die 83 Hybrid-DNA Proben wurden über STS-Marker charakterisiert, so dass nach einer genspezifische PCR eine beliebige Sequenz chromosomal kartiert werden konnte. Nach der Gelelektrophorese ergab sich entsprechend dem Ergebnis der positiven (1) oder negativen (0) PCR ein binärer 0-1 Code der Proben 1-83. Mit Hilfe dieses Codes wurde am Stanford Human Genome Center (<http://www-shgc.stanford.edu>) der nächstliegende STS-Marker mit Angabe der Wahrscheinlichkeit und dem kalkulierten Abstand (in centiRay) zur amplifizierten Sequenz bestimmt (Abb.6).

Tab.2: Verwendete Primer zur Kartierung der Gene in 1q und 11q über das G3 Radiation Hybrid Panel

Gen	5'-Primer Sequenz	3'-Primer Sequenz
ELBT	5'-TGGTCTTGTGCTTGTGCAAG-3'	5'-GTCATGGAGCTGACCTGGTT-3'
FZD4	5'-TGCTGTCTCTTGCCATGCACTTG-3'	5'-AAATTGCCTGGGGAAATTCTGGG-3'
MS4A6A	5'-CTGGCCGGCTTCACCTAACCTTG-3'	5'-TCCCAGAGTCTCATTCCCTTCGC-3'
YAP65	5'-GGCACCAGCTAGCACCTCTGTGTT-3'	5'-TTCCAACCTTTGCCCTCCTCAA-3'
DAP4	5'-TCAGAACCCAGCGAAGAAGA-3'	5'-TCAGCCTCATGTCCATCCAGA-3'
CGI-85	5'-GGGCTACAGCGCTGCTTTTATGC-3'	5'-CTTGGCGATTCCGAAAGTATGCC-3'
CLNS1A	5'-ATCAGCGTTGGAGGCAATGTTCA-3'	5'-TGTGGCTTGGCCTTCTGCTGTTA-3'
PPP2R5A	5'-TGGGTAGAGGCAGCTCAGGTG-3'	5'-CACTGTGGGACTCAAAGCCTC-3'
putatives Calpain	5'-TGAGTCCTGGGCACATTGGTCAT-3'	5'-CCCTCCACCACACTGCTTTCTCA-3'
DAF	5'-TGGGATCACGAGGAAAAGAGAAGGA-3'	5'-ACCCCTGGTTCACCAGCATGTTT-3'
HSPC186	5'-CACTGGAAGCTGGTGTTCGCTGT-3'	5'-GCTGTGGTGTTCAGATCCACGCT-3'

B.5 Zellkultur

B.5.1 Herkunft der Zelllinien

Die sechs Brusttumor-Zelllinien (MCF7, MDA231, MDA453, SKBR3, BT474, T47D) und drei Ovarialtumor-Zelllinien (BG-1, EB2, PA-1) wurden von der Firma Berlex, USA in kryokonservierter Form zugesandt.

B.5.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Brusttumor-Zelllinien (MCF7, MDA231, MDA453, SKBR3, BT474, T47D) wurden alle im folgenden Medium bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet und entsprechend der Zelldichte passagiert. Das Medium bestand aus Alpha MEM, 10% FKS, 0,1mM MEM Non Essential Amino Acids, 1mM MEM Sodium Pyruvate, 10mM HEPES, 2mM L-Glutamine, 50µg/ml Gentamycin (alle Life Technologies, Eggenstein) und 1µg/ml Insulin. Die Anzucht der Ovarialtumor-Zelllinien BG-1 und PA-1 erfolgte unter den gleichen Bedingungen im Kulturmedium Alpha MEM und 10% FKS. Die Ovarialtumor-Zelllinie EB-2 wurde in RPMI mit 10% FKS angezüchtet und wuchs als einzige der bearbeiteten Zelllinien in Suspension. Um ein Anheften dieser Zellen zu verhindern, wurde die Kulturflasche vertikal gestellt und regelmäßig geschwenkt.

B.6 Mikrodisektion

Die Mikrodisektion dient der Selektion distinkter Zellen und Gewebeareale. Sie wird eingesetzt, wenn sich die zu untersuchenden Zellen innerhalb eines sehr heterogenen Gewebes befinden und die weiteren Experimente ein möglichst homogenes Ausgangsmaterial erfordern (Sirivatanauksorn et al., 1999). Bei der lasergestützten Mikrodisektion wird das Zielgewebe durch ein computergesteuertes Mikroskop visualisiert, mittels entsprechender Software markiert und anschließend durch den Laser vom übrigen Gewebe getrennt. In dieser Arbeit wurde das UV-Laser Mikrodisektions-System SL Mikrotest (SL Mikrotest, Jena) verwendet. Ziel war es, gezielt Tumoreareale und normales Epithelgewebe der Brust zu isolieren und daraus RNA zu isolieren. Es wurde kryokonserviertes Gewebe eingesetzt, um eine gute Ausgangs-Qualität der RNA zu gewährleisten. Das sterile Vorgehen während der Mikrodisektion sollte sicherstellen, dass die Bearbeitung des Gewebes die Qualität der RNA nicht beeinflusst (Schutze et al.; 1998). Zur histologischen Bewertung der Gewebe wurden die fixierten Kryoschnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

B.6.1 Herkunft des Gewebes

Die kryokonservierten Proben von Brusttumoren und Normalgeweben wurden uns im Rahmen einer Kooperation mit der Pathologie des Universitätsklinikums Charité in Berlin überlassen. Es waren 13 invasiv duktile Karzinome und sechs invasiv lobuläre Karzinome unterschiedlicher Malignität (Grading). Die drei Normalepithel-Proben der Brust stammten zum Teil aus separaten Gewebeblöcken oder konnten aus Randbereichen der Tumorschnitte gewonnen werden.

B.6.2 Vorbereitung der Kryoschnitte

Auf gebackene Superfrost-Objektträger wurden ca. 2-3cm² große Folienabschnitte (Foliendicke: 2µm; SL Microtest, Jena) aufgezogen und an zwei Seiten mit Fixogum befestigt. Da die Folien nicht autoklavierbar waren, wurden die Objektträger mit Folie zur Sterilisation eine Stunde unter UV-Licht exponiert. Bei schlechter Haftung der Schnitte erfolgte die Beschichtung der Folie mit einer wässrigen 0,01%igen Poly-L-Lysin-Lösung.

Die kryokonservierten Gewebe wurden nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff umgehend ins Kryotom (Microm HM560, Microm Laborgeräte, Walldorf) überführt. Von jedem Präparat wurden jeweils 5-15 Gewebeschnitte zwischen 6µm und 8µm Dicke hergestellt und auf die vorbereiteten Objektträger mit Folie aufgezogen. Alle für die Fixierung und Färbung verwendeten Lösungen wurden mit 0,1% DEPC-behandeltem Millipore-H₂O angesetzt. Nach kurzem Lufttrocknen erfolgte die Fixierung der Schnitte 30sec in 70%igem Ethanol. Die Schnitte wurden kurz in H₂O_{DEPC} gespült, 1min 30sec in Hämalun nach Mayer gefärbt, kurz in H₂O_{DEPC} gespült, jeweils 1min in 70% und 95% Ethanol entwässert, 30sec in Eosin Y (0,1% alkoholisch) gefärbt und zuletzt zweimal 2min in 95% Ethanol und 1min in absolutem Ethanol entwässert. Anschließend wurden die Schnitte mit der Folie abgelöst und mit der Schnittseite nach unten auf einen frisch gebackenen, mit Xylol versehenen Objektträger überführt. Nach dem Verdunsten des Xylols wurde die Folie glattgestrichen und mit Klarlack an den Objektträger fixiert. Nach einstündiger Trocknung waren die Schnitte bereit für die Mikrodissektion.

B.6.3 Durchführung der lasergestützten Mikrodissektion

Die lasergestützte Mikrodissektion erfolgte mit dem UV-Laser Mikrodissektions-System SL Mikrotest (Manual SL Mikrotest, Jena). Der Objektträger mit dem Kryoschnitt wurde auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und das Gewebe histologisch begutachtet. Anschließend wurde auf die ausgewählten Gewebeareale ein steriles Kunststoff-Cap (CapSure, Arcturus Engineering, CA, USA) aufgesetzt und leicht angedrückt. Das Cap diente zur Ablösung und Überführung des mikrodissezierten Areals. Die zu mikrodissezierenden Tumor- und Normalgewebe-Areale wurden, visualisiert durch das zugehörige Softwareprogramm, am Bildschirm vorgezeichnet, um als Vorlage für den Laser zu dienen. Der computergesteuerte, motorisierte Mikroskoptisch ermöglichte das Abfahren des eingezeichneten Areals durch den UV-Laser (Abb.7). Die Einstellungen (Leistung, Geschwindigkeit) am Laser erfolgten in Abhängigkeit zum Schneideerfolg. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Gewebeareale mittels des Caps abgehoben und in ein 0,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Für die RNA-Isolierung wurden die Schnitte in Lysispuffer (Guanodinium-Isothiocyanat-Lösung) mit 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen. Dabei wurden sämtliche ausgeschnittenen Areale eines Gewebetyps der Patientin (ca. 20mm² Fläche) vereinigt und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

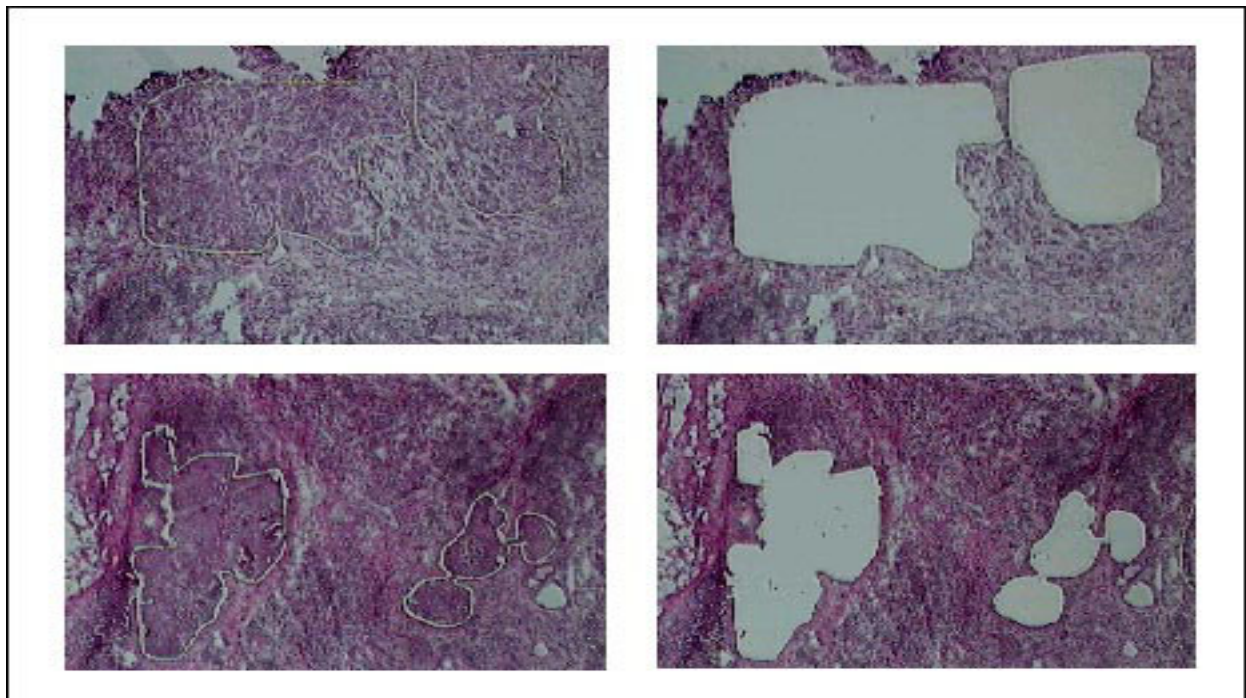


Abb.7: Vorgehensweise der lasergestützten Mikrodissektion. Die linken Bilder zeigen die mit dem Laser umfahrenen Tumoreale der Brust (oben: IDC; unten: DCIS). In den rechten Bildern ist der Gewebeschnitt nach Abnahme des Caps mit den ausgeschnittenen Arealen dargestellt.

B.7 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

B.7.1 Kommerzielle mRNA-Proben

Für die Taqman-Analysen wurden neben der isolierten RNA aus den mikrodisssezierten Gewebeproben auch kommerzielle mRNA-Proben aus 22 unterschiedlichen humanen, normalen Geweben von den Firmen Clontech, Palo Alto, CA, USA und Invitrogen, Groningen bezogen.

B.7.2 Isolierung der poly(A⁺)mRNA aus Zelllinien

Aus den Zellen einer 175cm² Kulturflasche der jeweiligen Tumorzelllinien wurde die poly(A⁺)mRNA durch das PolyATtract System 1000 (Promega, Madison, WI, USA) isoliert. Diese Methode beruht auf den lysierenden und Ribonuklease-inhibierenden Eigenschaften von Guanidinium-Isothiocyanat (GTC) mit β -Mercaptoethanol. Die poly(A⁺)mRNA wird mittels biotinylierter Oligo(dT)-Primer und Streptavidin-gekoppelter paramagnetischer Partikel (SA-PMP) aus dem Lysat isoliert und aufgereinigt.

Durchführung:

Der Überstand der Zellkulturen wurde verworfen und die Zellen mit 4ml GTC-Extraktionslösung (4M GTC; 25mM Natriumcitrat, pH7,1) und 2% β -Mercaptoethanol lysiert. Mit einem sterilen Zellschaber wurden die Zellen anschließend aus der Kulturflasche transferiert und das Lysat zum Aufschluss der Zellen mehrmals durch eine Kanüle (0,9mm) gezogen. Im nächsten Schritt wurde das Lysat mit 8ml auf 70°C vorgewärmtem Verdünnungspuffer (6xSSC, 10mM Tris-HCl pH7,4, 1mM EDTA, 0,25% SDS) gemischt, 500pmol Oligo(dT)-Primer zugegeben und 5min bei 70°C inkubiert. Nach 5min Abkühlung wurde das Lysat bei Raumtemperatur (Rt) zentrifugiert (12.000g, 10min), der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6ml SA-PMP, die zuvor dreimal mit 0,5xSSC gewaschen wurden. Nach Mischung und 5min Inkubation bei Rt wurde das Röhrchen in den Magnetständer gestellt, um die poly(A⁺)mRNA-gebundenen Partikel abzutrennen. Das klare Lysat wurde verworfen und die Partikel dreimal in 0,5xSSC gewaschen. Im letzten Schritt wurde die poly(A⁺)mRNA in 1ml H₂O_{DEPC} aufgenommen, die SA-PMP im Magnetständer abgetrennt und die gelöste mRNA bei -80°C konserviert.

B.7.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus mikrodisssezierten Geweben

Aus den mikrodisssezierten Geweben wurde die Gesamt-RNA nach dem geläufigen Protokoll mittels Guanidinium-Isothiocyanat (GTC) und saurem Phenol isoliert (Chomczynski et al., 1987). Durch diese Aufarbeitungsmethode sollten die RNA-Verluste bei den geringen mikrodisssezierten Gewebemengen minimal gehalten werden. Dabei werden durch das GTC als chaotrope Substanz Proteine denaturiert. Natriumcitrat wirkt als Puffersubstanz, das Natriumlauroylsarkosin als Detergenz. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol dient der Inhibition von RNasen durch Denaturierung. Das saure Phenol bindet DNA und Proteine, während die RNA in der wässrigen Phase bleibt und durch mehrfache Fällung gereinigt wird.

Durchführung:

Die Gewebeproben wurden nach der Mikrodisssektion in 50 μ l GCS-Lösung (4M GTC, 25mM Natriumcitrat pH7,0, 0,5% Na-Lauroylsarkosin) mit 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 5 μ l 2M Natriumacetat (pH4,0), sowie 50 μ l einer Mischung aus saurem Phenol und Chloroform im Verhältnis 5:1 gegeben. Nach Zentrifugation (12.000xg, 20min, 4°C) wurde die wässrige Phase abgenommen und zur Fällung 20 μ l Isopropanol zugegeben. Nach einstündiger Fällung bei -20°C und Zentrifugation (12.000xg, 20min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde nochmals in 20 μ l GCS-Lösung aufgenommen und mit 1 Vol Isopropanol wie oben gefällt. Anschließend wurde das RNA-Pellet in 20 μ l H₂O_{DEPC} gelöst, mit 2 μ l 3M NaAc (pH5,2) und 40 μ l absolutem Ethanol erneut 1h bei -20°C gefällt und abzentrifugiert (12.000xg, 30min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet zweimal mit 20 μ l 80%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (12.000xg, 5min, 4°C) und schließlich in 20 μ l H₂O_{DEPC} aufgenommen. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mittels RiboGreenTM bestimmt.

B.7.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung von Konzentrationen von DNA und RNA erfolgte mit RiboGreenTM bzw. PicoGreenTM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Gegenüber der spektrometrischen Messung von RNA können bei dieser sensitiven Methode durch die spezifische Bindung der fluoreszierenden Ribogreen-Partikel sehr geringe RNA-Konzentrationen bis zu 1ng/ μ l gemessen werden. Die RiboGreen-Stammlösung wurde zur Messung von RNA-Endkonzentrationen im Bereich von 1-50ng/ml

(bzw. 20-1000ng/ml) 1:2000 (bzw. 1:200) mit TE-Puffer verdünnt. Die PicoGreen-Stammlösung wurde immer 1:200 verdünnt. Von der Standard-Nukleinsäure-Lösung bekannter Konzentration wurde eine Eichreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen im angegebenen Messbereich erstellt. Für die Messung wurden sowohl die Standard-Lösung, als auch die Versuchsproben in 100µl TE-Puffer verdünnt und in einer optischen Platte mit 100µl der verdünnten Ribogreen- oder Picogreen-Lösung gemischt. Die Extinktion der Proben wurde im Fluoreszenzscanner bestimmt. Nach linearer Regression der Eichgeraden konnten die Konzentrationen der Versuchsproben bestimmt werden.

B.7.5 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die RNA mittels Oligo-(dT)- oder Hexamer Primer und dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA ist stabiler und kann als Matrize für PCR-basierte Experimente genutzt werden. Dabei wurde für größere RNA-Konzentrationen (>50ng; Zelllinien, kommerzielle RNA-Proben) der OmniscriptTM-RT-Kit (Qiagen, Hilden), für geringe RNA-Konzentrationen (<50ng; mikrodisezierte Proben) der SensiscriptTM-RT-Kit (Qiagen) verwendet. Sämtliche Bestandteile bis auf den Oligo-(dT)-Primer (Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurden den Qiagen-Kits entnommen.

Für die cDNA-Synthese wurde die RNA mit 1x Reverse Transkriptase-Puffer, dNTP-Mix (0,5mM je dNTP), 1µM Oligo-(dT)-Primer, 10 Units RNase Inhibitor und 1µl Reverse Transkriptase angesetzt (für 20µl Ansatz). Dabei wurde die Gesamt-RNA der mikrodisezierten Proben vollständig eingesetzt oder bei der ausreichenden poly(A⁺)-mRNA der Zelllinien und kommerziellen Gewebeproben eine konstante Menge von 500ng in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz inkubierte 1h bei 37°C und wurde anschließend zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase 5min auf 95°C erhitzt. Die Aufbewahrung der cDNA-Proben erfolgte bei -80°C.

B.8 Aufarbeitungen und Bestätigung von cDNA-Klonen

Zur Durchführung von Expressionsanalysen für die zu untersuchenden Gene wurden spezifische *E.coli*-Klone bestellt und aufgearbeitet. Um sicherzustellen, dass zu allen Genen bestätigte cDNA-Sequenzen vorliegen, wurden mehrere Klone bearbeitet. Die Klone wurden ausgestrichen, Einzelkolonien gepickt, in Flüssigkultur vermehrt und die Plasmid-DNA präpariert. Dabei enthalten diese cDNA-Klone Teilsequenzen der Gene, die nach der Plasmid-DNA-Präparation mittels Sequenzierung bestätigt werden sollten. Aus den bestätigten cDNA-Proben erfolgte die Generierung der Sonden für quantitative Expressionsanalysen und die RNA in-situ Hybridisierung. Zuvor wurde sichergestellt ("RepeatMasker"), dass sich in der cDNA-Sequenz keine repetitiven Basenabfolgen befinden, die unspezifische Signale in der Northernblot-Analyse verursachen könnten.

B.8.1 Herkunft der cDNA-Klone für die bearbeiteten Gene

Für die Auswahl der cDNA-Klone standen zum einen die über AUTEX generierten Assemblies der entsprechenden Gene zur Verfügung, zum anderen konnte bei den bekannten Genen die cDNA-Klone über den UniGene-Datenbankeintrag (NCBI) in Erkenntnis gebracht werden (Tab.3a, 3b). Dabei wurden öffentliche Bakterien-Klone ausgewählt und bei Incyte Genomics (St. Louis, MO, USA) bestellt. Die Klone wurden als Agarsteps geliefert und konnten sofort ausgestrichen werden.

Tab. 3a: Bearbeitete cDNA-Klone der Gene auf Chromosom 1. Die entsprechenden Angaben zu den Klonen sind den jeweiligen Kloninformationen (Entrez, NCBI) entnommen (k.A.: keine Angaben).

Gene auf Chromosom 1	IMAGE Klon-ID	GenBank Acc. Nr.	Vektor	Ursprungsgewebe	Insert-Size in bp
PPP2R5A	841208 3'	AA486712	pBluescript SK-	Lunge	2346
	41356 5'	R59164	Lafmid BA	Gehirn	1908
	668858 5'	AA234321	pT7T3D-Pac	k.A.	k.A.
ERT/ ELF3	770910 5'	AA433851	pT7T3D	Ovartumor	k.A.
	308288 5'	W24679	pT7T3D	fetale Lunge	1704
	591374 3'	AA159295	pBluescript SK-	Pankreas	457
putatives Calpain	365665 5'	AA025386	pT7T3D	fetales Herz	410
	1086969 3'	AA583505	pBluescript SK-	k.A.	660
	365665 3'	AA026030	pT3T7D	fetales Herz	410
	2142037 3'	AI446497	pCMV-Sport6	Adenokarzinom	1820
	2189119 3'	AI537761	pCMV-Sport6	k.A.	1557
	2506373 3'	AW007803	pT7T3D-Pac	Dickdarm	1004
DAF/ CD55	668796 3'	AA262303	pT7T3D-Pac	k.A.	682
	239335 5'	H71561	pBluescript SK-	Riechepithel	k.A.
	131473 5'	R23380	pT7T3D	Plazenta	1230
HSPC186	740243 5'	AA477024	pT7T3D	Ovartumor	1691
	152739 5'	R47823	pT7T3D	Brust	913
	186580 5'	H43255	pT7T3D	Brust	4093

Tab. 3b: Bearbeitete cDNA-Klone der Gene auf Chromosom 11. Die entsprechenden Angaben zu den Klonen sind den jeweiligen Kloninformationen (Entrez, NCBI) entnommen (k.A.: keine Angaben).

Gene auf Chromosom 11	IMAGE Klon-ID	GenBank Acc. Nr.	Vektor	Ursprungsgewebe	Insert-Size in bp
ELBT	161288 5'	H25327	pT7T3D	Brust	982
	161484 3'	H25560	pT7T3D	Brust	676
	358629 5'	W96417	pT7T3D	fetales Herz	946
	1276329 3'	AA693505	pT7T3D-Pac	Hoden	1612
FZD4	146058 5'	R79705	pT7T3D	Plazenta	1039
	429599 5'	AA011621	pT7T3D	fetale Leber, Milz	1270
	233782 5'	H64595	pT7T3D	fetale Leber, Milz	2159
MS4A6A	207240 3'	H59599	pT7T3D	fetale Leber, Milz	1267
	148348 5'	H13072	pT7T3D	Plazenta	775
	243038 5'	H95741	pT7T3D	fetale Leber, Milz	1592
YAP65	308163 5'	W24622	pT7T3D	fetale Lunge	1440
	268971 5'	N36721	pT7T3D	Melanocyten	k.A.
	1131225 3'	AA610311	pT7T3D-Pac	Brust	982
Cyclin D1	199371 5'	R97329	pT7T3D	fetale Leber, Milz	3230
	309834 5'	W24017	pT7T3D	Fibroblasten	519
DAP4	838220 5'	AA457452	pBluescript SK-	fetale Retina	k.A.
	595208 5'	AA173504	Bluescript SK-	Ovar tumor	691
	594345 5'	AA169668	Bluescript SK-	Ovar tumor	k.A.
CGI-85	826099 3'	AA521414	pT7T3D-Pac	B-Zellen	k.A.
	545163 3'	AA076053	Bluescript SK-	Ovar tumor	472
	294739 5'	W03217	pT7T3D	fetale Leber, Milz	k.A.
CLNS1A	845595 3'	AA644338	pBluescript SK-	Lungentumor	1023
	72050 5'	T52435	pBluescript SK-	fetale Milz	970
	501458 5'	AA135531	pT7T3-Pac	Uterus	920
Fau 1	724122 5'	AA411247	pT7T3D	Ovar tumor	1068
	5'	AA321581	pBluescript SK-	Lymphoid	k.A.
	491497 5'	AA148815	pT7T3-Pac	Uterus	1438
SIP	739270 5'	AA421233	pT7T3D	Ovar tumor	1198
	770968 5'	AA428091	pT7T3D	Ovar tumor	k.A.
	47920 5'	H11992	Lafmid BA	Gehirn	1098

B.8.2 Präparation der Plasmid-DNA

Aus den gelieferten Agarsteps wurden die Klone auf Agarplatten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Nach Vermehrung der Klone in Flüssigkultur erfolgte die Minipräparation der Plasmid-DNA. Durch den Restriktionsverdau der Plasmid-DNA-Proben sollten die cDNA-Fragmente isoliert und über die anschließende Sequenzierung bestätigt werden. Die positiven Klone wurden erneut in einem großen Volumen kultiviert, um nach der Maxipräparation ausreichende cDNA-Mengen für die weiteren Expressionsexperimente zu gewinnen. Die durchgeführte Methode der Präparation von Plasmid-DNA beruhte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979). Dabei wird chromosomale Bakterien-DNA durch alkalische Denaturierung und Fällung von der Plasmid-DNA getrennt.

Kultivierung:

Die Klone wurden in LB-Agar mit 100µg/ml Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin (Fluka Biochemika, Neu-Ulm), abhängig von der Resistenz ausgestrichen und etwa 12h bei 37°C kultiviert. Von jedem Klon wurden drei Einzelkolonien gepickt und in einer 2ml LB-Medium-Flüssigkultur 10h bei 37°C kultiviert. Von dieser Flüssigkultur wurden 0,5ml für ein 1ml Glyzerinstock (15% Glyzerin) angelegt, aus den restlichen 1,5ml erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA. Für die Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden von dem Glyzerinstock der Klone 500ml LB-Medium angeimpft und etwa 14h bei 37°C kultiviert.

Minipräparation der Plasmid-DNA:

Die Minipräparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die 1,5ml Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (12000xg, 30sec, Rt) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 150µl Resuspensionspuffer (100mM Tris-HCl, pH7,5, 10mM EDTA, 400µg/ml RNaseI) durch Vortexen aufgenommen, anschließend unter Durchmischung 150µl Lysisbuffer (200mM NaOH, 1% SDS) und 300µl Neutralisationspuffer (3M KAc, pH5,5) dazugegeben. Die denaturierte *E.coli*-DNA und die Proteine wurden abzentrifugiert (12.000xg, 5min, Rt) und der Überstand auf die vorbereiteten GFX™-Säulen gegeben. Nach einminütiger Inkubationszeit erfolgte die Zentrifugation der Proben (12000xg, 30sec, Rt), um die Plasmid-DNA an die Säule zu binden. Nach einem Waschschrift mit 400µl Waschpuffer (80% Ethanol in Tris-EDTA Puffer) wurde die DNA mit 50µl TE-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

Maxipräparation der Plasmid-DNA:

Die Maxipräparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX500-Kit (Macherey-Nagel, Düren). Im ersten Schritt wurde der 500ml Kulturanatz zentrifugiert (5000xg, 15min, 4°C), das Pellet mit 12ml Lösung S1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNaseI, pH8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 12ml Lösung S2 (200mM NaOH, 1% SDS) 5min bei Rt inkubiert. Die Suspension wurde nach Zugabe von 12ml Lösung S3 (2,8M KAc, pH5,1) 5min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (15.000xg, 1h, 4°C). Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend auf die mit 5ml Puffer N2 (15% Ethanol, 100mM Tris, 900mM KCl, pH6,3) equilibrierten Säulen gegeben. Nach dem zweimaligem Waschen der Säule mit je 12ml Puffer N3 (15% Ethanol, 100mM Tris, 1,15M KCl, pH6,3) wurde die Plasmid-DNA

mit 12ml Puffer N5 (15% Ethanol, 100mM Tris, 1M KCl, pH8,5) eluiert. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung wurde die gelöste DNA mit 0,7 Vol Isopropanol 60min bei Rt gefällt und abzentrifugiert (18.000g, 30min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und in 500µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde über Gelelektrophorese neben einem DNA-Standard bestimmt.

B.8.3 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau diente der Abtrennung des genspezifischen cDNA-Inserts von der Vektor-DNA. Dabei werden Restriktionsenzyme eingesetzt, deren Erkennungssequenzen sich an den die cDNA-flankierenden Klonierungsstellen befinden. Die Auswahl der Restriktionsendonukleasen richtete sich nach den Klonierungsvektoren (Tab.4). Nach der Elektrophorese wurde die cDNA für die Sondenherstellung aus dem Gel extrahiert werden.

Tab. 4: Enzymkombinationen für den Restriktionsverdau der jeweiligen Vektoren

Vektor	Enzym 1	Enzym 2	Reaktionspuffer
PT7T3D (-PAC)	EcoRI (Aval)	HindIII (NotI)	Puffer B (H)
(p)Bluescript SK-	EcoRI (Xbal)	XhoI (PstI)	Puffer H
Lafmid BA	EcoRI	HindIII	Puffer B
pCMV-Sport6	EcoRI	HindIII	Puffer B

Durchführung:

Für den Restriktionskontrollansatz wurden 500ng Plasmid-DNA mit 5 Units der für den Vektor entsprechenden Enzyme (Kombination aus Enzym1 und Enzym2) und 1x Restriktionspuffer (alle Roche Diagnostics, Mannheim) in einem 20µl Ansatz für 2-3h bei 37°C verdaut. Zur Sondenpräparation wurden 10µg Plasmid-DNA mit jeweils 20 Units der Enzyme in einem 50µl Ansatz 3h verdaut. Der Ansatz wurde anschließend mit 1/6 Vol Gel-Ladepuffer versetzt, zusammen mit einem DNA-Größenstandard in einem 1%iges Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung (0,5µg/ml in H₂Odest ; 15min) detektiert.

B.8.4 Sequenzierung der cDNA-Inserts

Die Sequenzierung wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Reaktion durchgeführt (Sanger et al., 1977). Dabei werden die DNA-Moleküle in einem zyklischen Prozess denaturiert, ein Primer gebunden und der dabei gebildete DNA-Primer-Doppelstrang durch DNA-Polymerasen verlängert. Im Sequenzierungsansatz sind neben den üblichen Nukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide enthalten, die zum Kettenabbruch führen. Jeder der vier Basen dieser markierten Nukleotide enthält ein Fluorophor mit spezifischer Emissionswellenlänge. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden nach der PCR-Amplifikation elektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die unterschiedlichen Fluorophore, die eine spezifische Base repräsentieren, werden am Ende der Auftrennung durch einen Laser angeregt und die emittierte Strahlung detektiert. Durch Übertragung der Sequenzinformationen auf ein entsprechendes Software-Programm (gap4) kann die ermittelte Sequenz mit der bestehenden Sequenz des Gens verglichen und bestätigt werden.

Für die Sequenzierungsansätze wurden mit dem BigDye-Mix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystem, Weiterstadt) und dem DyeET-Mix (DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Premix, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zwei kommerzielle Sequenzierungsreaktions-Kits eingesetzt. Die Auswahl der Sequenzierprimer richtete sich nach dem Klonierungsvektor der genspezifischen Plasmid-DNA-Proben (Tab.5). Die Elektrophorese und Übertragung der Sequenzierdaten erfolgte im Sequenzierautomat ABI Prism™ 377 (PE Applied Biosystem, Weiterstadt).

Tab. 5: Auswahl der Sequenzierprimer für die entsprechenden Vektoren

Vektor	5'-Primer Sequenz	3'-Primer Sequenz
pT7T3D (-PAC)	5'-TGTAACGACGGCCAGT -3'	5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'
(p)Bluescript SK-	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'	5'-GTAAACGACGGCCAGT -3'
Lafmid BA	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
pCMV-Sport6	5'-TGTAACGACGGCCAGT -3'	5'-GGAAACAGCTATGACCATG -3'

Vorbereitung der Sequenzierproben:

Für einen 15µl Sequenzierungsansatz mit dem BigDye-Kit wurden 3µl BigDye-Mix, 1µl Sequenzierprimer (5pmol/µl) und etwa 500ng Plasmid-DNA vermischt und über 30 Zyklen (95°C, 30sec; 50°C, 10sec; 60°C, 4min) amplifiziert. Für die Sequenzierung mit dem DyeET-Kit wurden in einem 15µl Ansatz 6µl DyeET-Mix, 1µl Sequenzierprimer

(5pmol/µl) und etwa 500ng Plasmid-DNA eingesetzt und über 25 Zyklen amplifiziert (95°C, 20 sec; 50°C, 15sec; 60°C, 1min). Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion wurde der Ansatz über Sephadex G-50 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gereinigt. Als Vorbereitung wurde in eine 96-well-Multi-Screen-HV-Platte (Amersham) ca. 0,3mg Sephadex G-50 eingefüllt, mit je 300µl Millipore-Wasser versetzt und 3h quellen gelassen. Die hergestellten Säulen wurden vor dem Gebrauch abzentrifugiert (910xg, 5min, Rt), die Sequenzierreaktion aufgetragen und im folgenden Zentrifugationsschritt (wie oben) von freien Terminatormolekülen gereinigt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Sequenziergel bei 80°C im Brutschrank getrocknet und in 3µl Sequenzier-Auftragspuffer aufgenommen. Vor der Elektrophorese wurden die Proben in der 96-well-Platte 30min bei Rt geschüttelt, 5 min bei 80°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Elektrophorese im Sequenziergel und Auswertung der Daten:

Für die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierreaktion wurde ein 5,25%iges Polyacrylamidgel (48cm lang, 200µm dick; PAGE plus, Amresco, Solon, USA) mit 6M Harnstoff in 1xTBE gegossen und mit 0,5% TEMED und 0,05% Ammoniumpersulfat auspolymerisiert. Für die Elektrophorese wurden 1,5µl Sequenzierprobe aufgetragen und nach entsprechenden Einstellungen am Sequenzierautomat ABI Prism 377 aufgetrennt (Elektrophoreseleistung 200W, Gel-Temperatur 51°C, Laser-Leistung 40mW, Laufzeit 12h, CCD-Einstellung 250, CCD-Empfindlichkeit 2, CCD X Pixel Position 196). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der zu den Sequenzierautomaten ABI Prism 377 gehörenden Macintosh-Software. Die qualitative Auswertung und Formatierung der Sequenzdaten wurde mit den Programmen "reap" und "scope" (Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) durchgeführt. Anschließend wurden die Sequenzabschnitte unter den im Programm "gap4" bestehenden Assemblies der Gene editiert und im Falle von Sequenzidentität integriert.

B.9 Expressionsanalyse über Northernblot und cDNA-Arrays

Nach der Sequenzierung konnten die bestätigten cDNA-Klone zur Generierung von genspezifischen Sonden verwendet werden. Von den in Tab.3a und 3b (Kap.B.8.1) aufgelisteten Genen wurde jeweils die aufgearbeitete cDNA des erstgenannten Klon eingesetzt. Durch die Northernblot-Hybridisierung sollte zum einen die Spezifität der Sonde getestet und zum anderen das Expressionsverhalten der Gene in verschiedenen Geweben untersucht werden. Die nachfolgende Hybridisierung des cDNA-Arrays mit parallel aufgespotteten Tumor- und Normalgewebeproben diente zur Verifizierung der in-silico analysierten differentiellen Expression der Gene in Tumoren. Die Sondenpräparation war für beide Expressionsexperimente identisch. Die spezifischen cDNA-Fragmente wurden nach dem Restriktionsverdau aus dem Gel präpariert, aufgereinigt, ihre Konzentration bestimmt und radioaktiv markiert. Die Detektion der Expressionssignale erfolgte durch Radiographie oder mittels Phosphor-Imager (Fujifilm BAS-1800II) und der Quantifizierungs-Software ImageQuant.

B.9.1 Präparation der cDNA-Sonden

Der Restriktionsansatz mit 10µg Plasmid-DNA wurde wie in B.8.3 beschrieben verdaut und in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Ethidiumbromid-Färbung erfolgte die Präparation der genspezifischen Fragmente aus dem Gel bzw. die Extraktion der cDNA mit Hilfe des QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die ausgeschnittenen Gelstücke mit den cDNA-Fragmenten wurden abgewogen und jeweils 100µg Agarosegel 300µl Lysispuffer (QX1-Puffer) zugegeben. Von der resuspendierten QIAEXII-Lösung mit den Silikagelpartikeln wurden 20µl (extrahierte DNA-Mengen von 2-10µg) zugegeben und 10min bei 50°C in einen Schüttelinkubator gestellt. Anschließend wurden die Silikagelpartikel mit der adsorbierten DNA durch Zentrifugation (12.000g, 30sec, Rt) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das nach drei Waschschritten (1x 500µl QX1-Puffer, 2x 500µl Puffer PE) luftgetrocknete Pellet in 20µl Tris-Puffer (10mM Tris-Cl, pH8,5) eluiert. Zur Konzentrationsabschätzung wurde die eluierte cDNA erneut elektrophoretisch neben einem DNA-Standard (Marker III, Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetrennt und durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit dem Standard nach Protokoll des Herstellers quantifiziert. Die cDNA-Proben wurden schließlich zu 25ng aliquotiert und bei -20°C gelagert.

B.9.2 Kontroll-Dot Blot

Als Positivkontrolle für die Northernblot- und cDNA-Array-Hybridisierung wurde spezifisch für jedes Gen ein Kontroll-Dot-Blot hergestellt. Bei diesem Kontroll-Dot-Blot wurde die eingesetzte cDNA-Sonde in absteigenden Konzentrationen (1ng; 100pg, 10pg, 1pg) auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) transferiert und über UV-Strahlung immobilisiert ("UV-cross-linking" bei 120mJ/cm²).

B.9.3 Northernblot- und cDNA-Array-Hybridisierung

Die Northernblot- und cDNA-Array-Analysen erfolgten durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden. Für die Gewebeexpression wurden die kommerziell erhältlichen MTN-Blots ("Multiple Tissue Northern"-Blot 1+2, Clontech, Palo Alto, USA) eingesetzt. Die beiden Nylon-Membranen mit mRNA von 16 unterschiedlichen humanen Geweben (MTN1: Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas; MTN2: Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovar, Dünndarm, Dickdarm, periphere Blut-Leukocyten) waren gebrauchsfertig zur Hybridisierung. Die verwendeten cDNA-Arrays (Matched Tumor/Normal Expression Array; Cancer Profiling Array, beide Clontech) basieren auf der SMARTTM cDNA Synthese (Clontech) von mRNA aus verschiedenen Tumoren und Normalgeweben. Dabei werden die amplifizierten cDNA-Proben auf die Nylonmembran gespottet. Informationen zu den Tumoren wurden aus den Protokollen des Herstellers entnommen. Für beide Expressionssysteme wurden Kontroll-cDNA-Proben der ubiquitär exprimierten Gene β -Aktin und Ubiquitin mitgeliefert.

Radioaktive Markierung der Sonden:

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) mit Hilfe des MegaprimeTM DNA Markierungs-System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und wurde nach angegebenen Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden 25ng der cDNA-Sonde mit 1 μ g Nonamer-Primer in einem 28 μ l Ansatz vermischt, und 5min bei 95°C-100°C denaturiert. Nach langsamen Abkühlen der Reaktion, das die Bindung der Primer ermöglicht, wurden 10 μ l Markierungspuffer (dATP, dGTP, dTTP in Tris/HCl, pH7,5; MgCl₂, β -Mercaptoethanol), 50 μ Ci[α -³²P]dCTP (10mCi/ml, Amersham) und 2 Units Klenov-Enzym zu einem 50 μ l Markierungsansatz zugegeben. Der Ansatz inkubierte zur Zweitstrangsynthese 30min

bei 37°C. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des Ansatzes über Sephadex-Säulen (Sephadex G-50, Amersham), um ungebundene Nukleotide abzutrennen. Nach Vorbereitung der Säule (720xg, 1min, Rt) wurde der Ansatz über die Säule zentrifugiert (720xg, 2min, Rt). Zur Hybridisierung des MTN-Blots wurde dieser Ansatz 5min bei 95-100°C denaturiert und auf Eis gestellt.

Für die cDNA-Arrays wurde der markierte 50µl Ansatz nach Aufreinigung über die Sephadex-Säule mit 50µl 20xSSC, 30µg COT1-DNA (Roche, Mannheim) und 150µg Heringssperma-DNA in 200µl Gesamtvolumen versetzt, danach 5min bei 95-100°C denaturiert und 30min bei 68°C inkubiert.

Hybridisierung des Northernblots und des cDNA-Arrays:

Der MTN-Blot wurde in 10ml vorgewärmter ExpressHyb-Lösung (Clontech) für 30min bei 68°C prähybridisiert und in 5ml ExpressHyb mit der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde 1h bei 68°C hybridisiert. Anschließend wurde der Blot zweimal für 15min in 2xSSC/0,05%SDS bei Rt und ein- bis dreimal für 15min in 0,1xSSC/0,1%SDS bei 50°C gewaschen (bis zu einer Aktivität von 70-180Beq/cm²). Zur Detektion wurde der Blot in einer Kassette mit Hyperscreen-Verstärkerfolien (Amersham) fixiert und ein Film (Biomax MS-1, Kodak) ca. 24h zur Exposition aufgelegt.

Der cDNA-Array wurden in 10ml vorgewärmter ExpressHyb-Lösung (Clontech) mit 1,5mg Heringssperma-DNA für 30min bei 65°C prähybridisiert und anschließend in 5ml ExpressHyb mit der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde über Nacht bei 65°C hybridisiert. Der hybridisierte cDNA-Array wurde anschließend zweimal für 15min in 2xSSC/ 0,5%SDS bei 65°C und mehrmals in 0,1xSSC/ 0,5%SDS bei 65°C gewaschen (bis zu einer Aktivität von 70-180Beq/cm²). Zur Detektion wurde der Array in einer Phosphor-Screen Kassette (Molecular Dynamics, Amersham) über 6-12h exponiert und im Phosphor-Imager ausgewertet. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms ImageQuant (Molecular Dynamics, Amersham).

B.10 PCR-basierte Methoden und Klonierung

B.10.1 SMART-RACE-PCR

Mit Hilfe der RACE-Methode ("Rapid amplification of cDNA ends") lassen sich noch unbekannte 3'- oder 5'- Enden eines Gens amplifizieren und die gesamte cDNA eines unbekannten Gens klonieren (Chenchik et al., 1996; Bertoli et al., 1997). Für die 5'-RACE wurde der SMART-RACE-cDNA-Synthese-Kit (Clontech) verwendet. Bei der SMART-Erststrangsynthese der poly(A⁺)mRNA werden modifizierte Oligo(dT)-Primer (SMART-Oligonukleotide) und eine MMLV-Reverse Transkriptase eingesetzt, die über Terminale-Transferase-Aktivität verfügt. Erreicht die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der RNA, so werden einige Desoxy-Cytidin hinzugefügt. Im Ansatz befinden sich zudem die SMART-Oligonukleotide, die am 3'-Ende Oligo(dG) tragen. Diese binden an den Oligo(dC)-Schwanz des neusynthetisierten Erststrangs, wobei der Überhang des SMART-Oligos als verlängertes Template für die Reverse Transkription dient. In der nachfolgenden PCR kann das SMART-Oligo als 5'-Primer zusammen mit einem genspezifischen 3'-Primer genutzt werden, um das 5'-Ende des Gens zu amplifizieren. In dieser Arbeit wurde versucht, für ein unbekanntes Gen (ELBT) das 5'-Ende des Gens zu amplifizieren und über die nachfolgende Sequenzierung zu identifizieren.

Durchführung:

Aufgrund des Expressionsmusters im Gewebe wurde für das Gen ELBT poly(A⁺)mRNA aus Brustgewebe in cDNA umgeschrieben. In einem 5µl Ansatz wurden 1µg poly(A⁺)-mRNA, 1µl modifizierter Oligo(dT)-Primer (5'CDS; 10µM) und 1µl SMART-Oligo (10µM) 2min bei 70°C inkubiert und auf Eis gestellt. Für die Erststrang-Synthese wurden 2µl Erststrang-Puffer, 1µl DTT (20mM), 1µl dNTP (10mM) und 1µl MMLV Reverse Transkriptase zugegeben und 2h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Tricine-EDTA Puffer auf 250µl verdünnt, 7min bei 73°C erhitzt und bei -20°C gelagert. Zur Amplifikation des 5'-RACE Produktes wurde ein 50 µl PCR-Ansatz mit 2,5µl 5'-RACE cDNA, 1x Advantage 2 PCR Puffer, 1x Advantage 2 Polymerase Mix (Proofreading Polymerase und TaqStart Antikörper, Clontech), 0,2mM dNTP, 5µl UPM Primer Mix (5'-Primer für Smart-Oligo) und 0,2µM genspezifischer 3'-Primer von ELBT (5'-GGAAAGTAGTCTCGAAAGTAGC-3') angesetzt und über 25 Zyklen (94°C, 30sec; 65°C, 30sec; 72°C, 1min) amplifiziert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im 1,5%igen Agarosegel.

B.10.2 PCR von großen Transkripten

Für die Klonierung eines neuen Gens (ELBT) wurde versucht, über eine PCR den Bereich des ORFs zu amplifizieren. Die erwarteten PCR-Produkten (bis zu 2kb) ließen sich in einer Standard-PCR (Taq Polymerase) nicht amplifizieren. Daher wurde das ELONGASE Enzym System (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. In einem 50µl Ansatz wurden 50ng Brust-cDNA, 0,2mM dNTPs, je 0,2µM 3'-und 5'-Primer von ELBT (Tab.6), 10µl Puffer System A+B und 1µl Elongase Enzym Mix über 35 Zyklen (94°C, 30sec; 60°C, 30sec; 68°C, 3min) amplifiziert und im 0,8% Agarosogel aufgetrennt.

Tab. 6: ELBT-Primer zur Amplifikation und Klonierung des ORFs

ELBT-Produkt	5'-Primer Sequenz	3'-Primer Sequenz	Produktgröße in bp
P1	5'-TCTGCTGGGGTCTAGGCTGTTT -3'	5'-TAACCCACAGACACCCATGA -3'	1430
P2	5'-TCTGCTGGGGTCTAGGCTGTTT -3'	5'-AGAACACACAGGAGAGGGTT -3'	2280

B.10.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Klonierung der PCR-Produkte mit dem AdvanTage PCR Cloning Kit (Clontech) basiert auf der terminalen Transferase-Aktivität der hitzestabilen Taq Polymerasen, die am Ende der PCR an das 3'-Ende des Amplifikates ein einzelnes Deoxyadenosin anfügen (Clark et al., 1988). Diese PCR-Fragmente können mit hoher Effizienz in linearisierte Vektoren mit Tymidinüberhängen kloniert werden. Der pT-Adv Vektor zeichnet sich durch 3'-T-Überhänge aus, mit Hilfe derer im Ligationsansatz das PCR-Fragment einkloniert wird. Anschließend wird der Vektor in TOP10F' *E.coli* kompetente Zellen transformiert und durch LB-Medium mit X-GAL/IPTG die weißen Kolonien selektiert.

Durchführung:

Für einen 10µl Ligationsansatz wurden 50ng PCR-Produkt (< 1Tag alt), 50ng pT-Adv-Vektor, 4 Units T4 DNA Ligase in 1x Ligations-Puffer angesetzt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte mit 2µl Ligationsansatz und voraliquotierten 50µl TOP10F' *E.coli*-Zellen. Der Ansatz wurde 30min auf Eis inkubiert, anschließend 30sec im 42°C Wasserbad durch Hitzeschock behandelt und 2min auf Eis gestellt. Die transformierten Zellen wurden in 250µl vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und 1h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Daraufhin wurden jeweils 50µl bzw. 200µl eines Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit X-GAL (1,6mg), IPTG (0,95mg) und Ampicillin (50µg/ml) ausplattiert

und 18h bei 37°C kultiviert. Die weißen Kolonien wurden anschließend gepickt, die Plasmid-DNA präpariert und sequenziert (B.8.2-B.8.4).

B.10.4 Real-time Reverse Transkriptase-PCR (Taqman-PCR)

Die Taqman PCR ist ein automatisierter PCR-Assay, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan ermöglicht werden. Bei dieser sogenannten "Real-Time"-PCR wird bei den zu quantifizierenden Proben das entstehende Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal-übermittelndes System detektiert (Higuchi et al., 1992 und 1993). Die Ausgangsproben können anschließend über den logarithmisch dargestellten Verlauf der PCR innerhalb der exponentiellen Phase miteinander verglichen und der Expressionslevel des untersuchten Gens bestimmt werden.

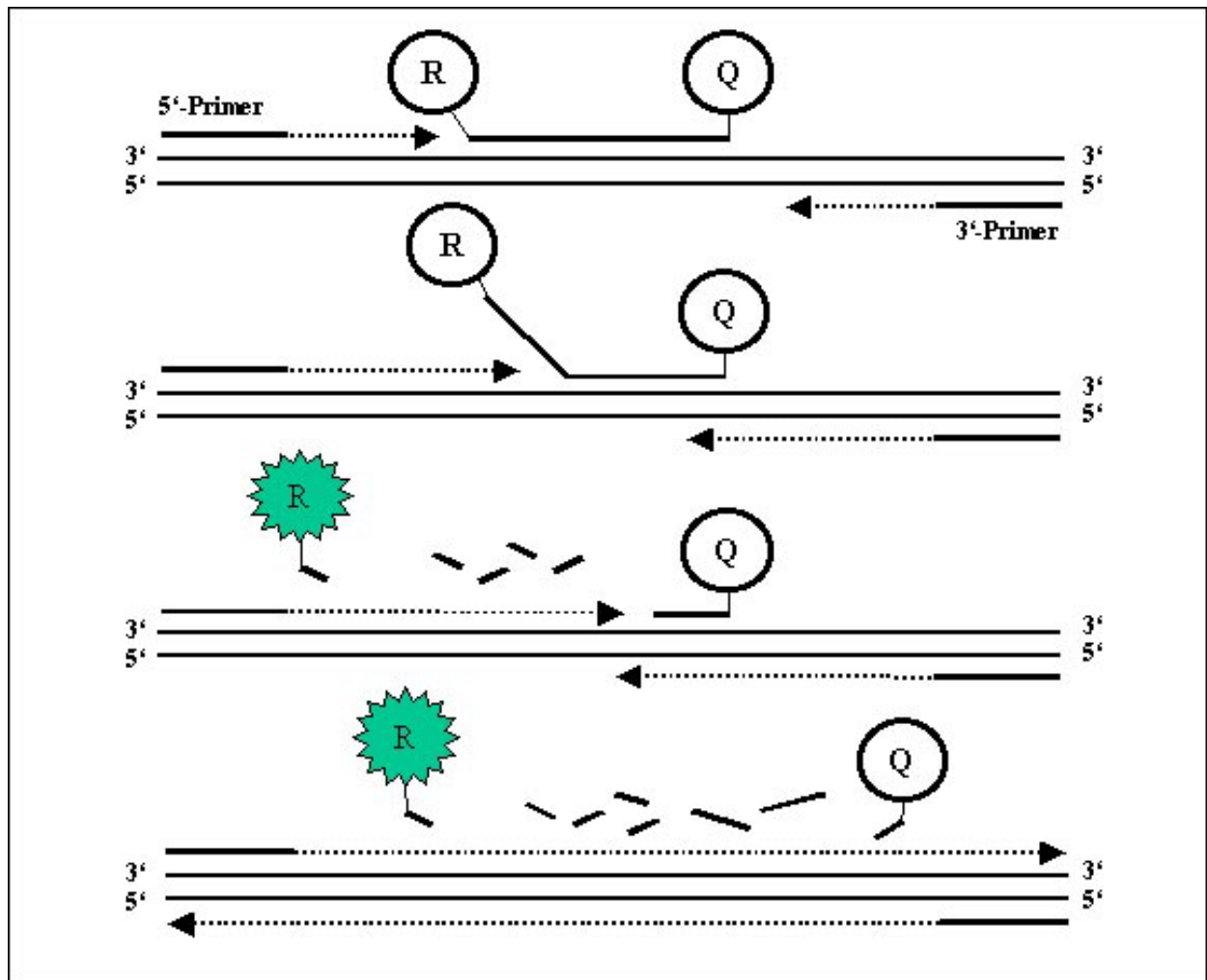


Abb.8: Prinzip der Taqman-PCR basierend auf 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase. Bei der Extension wird der Reporter-Farbstoff (R) vom Quencher-Farbstoff (Q) abgespalten und erzeugt ein Fluoreszenzsignal.

Bei der Detektion durch die fluoreszenzmarkierte, genspezifische Sonde wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase genutzt (Holland et al., 1991). Im ersten Schritt der PCR hybridisieren die spezifischen Primer und die fluoreszenzmarkierte Sonde an den Matrizen-Strang (Abb.8). Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert, deren Fluoreszenz von einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3'-Ende aufgrund der räumlichen Nähe unterdrückt wird. Bei der Extension verdrängt die Taq Polymerase die Sonde, die durch die 5'-3'- Exonuklease-Aktivität hydrolysiert wird. Dabei wird der Reporter-Farbstoff abgetrennt und kann nun ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Die Taqman-PCR mit fluoreszenzmarkierter Sonde erfolgte im GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Weiterstadt). Das Fluoreszenzsignal wurde während der PCR-Zyklen von einer CCD-Kamera empfangen und über ein entsprechendes Software-Programm (GeneAmp 5700 SDS Software, Perkin Elmer) prozessiert. Die benötigten PCR-Reagenzien (2xTaqman Universal PCR Master Mix mit AmpliTaq Gold, dNTP mit dUTP, AmpErase UNG, 25mM MgCl₂) wurden vom gleichen Hersteller bezogen. Uracil-N-Glycosylase (UNG) bewirkt durch das eingebaute dUTP den Abbau der Amplikons und wird als Schutz vor Kontamination mit Produkten früherer PCR-Experimente eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte durch eine 2-Schritt PCR mit 40 Zyklen (95°C, 15sec; 60°C, 1min) wobei zwei initiale Temperaturschritte (50°C, 2min; 95°C, 10min) vorausgingen. Aufgrund der Sensitivität dieser quantitativen PCR wurden von jeder cDNA-Probe drei identische PCR-Ansätze (Dreifachbestimmung) durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert mit der Standardabweichung berechnet.

B.10.4.1 Relative Quantifizierung

Im Falle einer 100% Effizienz der PCR müsste sich mit jedem Zyklus die Amplifikatmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal einer Probe verdoppeln. Die Effizienz der PCR eines bestimmten Amplifikates lässt sich durch die Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen einer Kontrollprobe bestimmen. Nach der Taqman-PCR wird das Fluoreszenzniveau bzw. die entstehende Amplifikatmenge in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt. Als Maß zur Quantifizierung der Ausgangsmenge des genspezifischen Templates wird der CT-Wert definiert. Dieser Wert gibt für jede cDNA-Probe an, bei welcher Zyklenzahl in der exponentiellen Phase ein vorher definiertes Fluoreszenzniveau (Basislinie) erreicht wird. Zum Vergleich der Expression eines Gens in unterschiedlichen cDNA-Proben

wurde eine relative Quantifizierungsstrategie gewählt (PE-Applied Biosystems, User Bulletin No.2). Dabei werden nicht die absoluten Kopienzahlen oder Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär homogen exprimiertes Gen bezogen (Bieche et al., 2001). Diese sogenannten "Housekeeping"-Gene wie GAPDH und β -Aktin dienen zur Normalisierung verschiedener Proben analog zur Northernblot-Analyse. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den experimentellen Proben wird auf ein Standard-Probenmaterial (Kalibrator) bezogen. Die mathematische Kalkulation der Expression erfolgte durch die $\Delta\Delta CT$ -Methode. Dabei wird im ersten Schritt für jede experimentelle Probe der CT-Wert des Referenzgens (z.B. GAPDH) vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (ΔCT). Nach dieser Normierung wurden von den ΔCT -Werten der experimentellen Proben der ΔCT einer Standard-Probe abgezogen ($\Delta\Delta CT$). Der relative Expressionslevel einer Probe normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ (GeneAmp 5700, User Manual, PE-Applied Biosystems).

B.10.4.2 Optimierung der Primer und Sonden

Die Auswahl der Sonden und Primer für die untersuchten Gene wurde mit einer speziellen Software des Herstellers (Primer Express, PE) abgeleitet (Tab.7).

Tab. 7: Sequenzen der verwendeten Primer und markierten Sonden für die Taqman-PCR.

Gen	5'-Primer Sequenz	3'-Primer Sequenz
ELBT	5'-CGGAACCGCAAGGGCT-3'	5'-TGTGAACTGGCCCTGCGTCATG-3'
MS4A6A	5'-ACCAACGGGCACAGTTGG-3'	5'-TGATGACATTTGATGGGAGCA-3'
CGI-85	5'-ACCAGTTTGTTCTTGATCCCTAT-3'	5'-CCTCGAGCTCCTCGAAGGA-3'
PPP2R5A	5'-GCCTTTCCAGTCCTCACAACC-3'	5'-TGGGACTCAAAGCCTCCATC-3'
putatives Calpain	5'-TCAGGAAGGCAGGTTTCACC-3'	5'-CGCATACCGCAGGGCA-3'
ERT/ ELF3	5'-CGGGCCATGAGGTACTACTACAA-3'	5'-ACGAGTCGCCGGCCA-3'
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
β -Aktin	5'-TGCATTGTTACAGGAAGTCCCTT-3'	5'-GGGAGAGGACTGGGCCAT-3'
Gen	markierte Sonde 5'-FAM / 3'-TAMRA	Produktgröße in bp
ELBT	5'-GTAGATGGGAACCAGGTCAGCT-3'	84
MS4A6A	5'-ACACCATCATGACATCACAACCTGTTCCC-3'	85
CGI-85	5'-TTTTCAAACACACCAAATGAATACTAGCGCCT-3'	80
PPP2R5A	5'-TCCTTCACCTAGTCCCTCCTGACCCAG-3'	71
putatives Calpain	5'-TCAACAGCCAGGTGCAGCAGACCA-3'	62
ERT/ ELF3	5'-CGGGAGATCCTGGAACGGGTGG-3'	62
GAPDH	5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'	206
β -Aktin	5'-CCATCCTAAAAGCCACCCCACTTCTCTCTA-3'	79

Die Auswahlkriterien für die Primersequenzen (MWG Biotech, Ebersberg) richteten sich nach Standardprotokollen. Für die untersuchten Gene in dieser Arbeit (außer GAPDH und β -Aktin) wurden intron-überspannende Primerpaare ausgewählt, um Auswirkungen möglicher genomischer Kontaminationen der eingesetzten cDNA-Proben in der Taqman-PCR zu vermeiden. Die Amplikon-Länge wurde für eine optimale PCR-Effizienz zwischen 75-150bp gewählt. Die zwischen den Primern lokalisierte Sonde wurde 5'-FAM (Reporter) und 3'-TAMRA (Quencher) fluoreszenzmarkiert eingesetzt (metabion, Martinsried). Um die optimalen PCR-Bedingungen für das zu untersuchende Gen zu erhalten, wurden spezifische Primer und Sonden vorher in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Durchführung:

Bei der Primermatrix wurden die Primerpaare (Tab.7) in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (50nM/50nM; 50nM/300nM; 50nM/900nM; 300nM/50nM; 300nM/300nM; 300nM/ 900nM; 900nM/50nM; 900nM/300nM; 900nM/900nM). Der 25 μ l PCR-Ansatz bestand aus 1x PCR Master Mix, 100nM genspezifische Sonde, 2ng cDNA Standardprobe und den variierten Primerkonzentrationen und wurde in einer 2-Schritt PCR (95°C, 15sec; 60°C, 1min) amplifiziert. Die Primerkonzentration, die den geringsten CT-Wert ergab, wurde für die weiteren Experimente eingesetzt. Bei der Sondenmatrix wurde ein PCR-Ansatz mit optimierten Primerkonzentrationen unter den gleichen Bedingungen wie oben angesetzt, wobei die Konzentrationen der Sonde (50nM, 100nM, 150nM, 200nM) variiert wurden. Die weiteren Experimente erfolgten mit der Sondenkonzentration des geringsten CT-Werts.

Mit den oben eingestellten Primer- und Sondenkonzentrationen wurden die Effizienz der PCR über eine Standard-Poben-Verdünnungsreihe überprüft. Dabei wurde ein PCR-Ansatz unter den gleichen Bedingungen wie oben gewählt, wobei Verdünnungsstufen der Standard-Probe von 4ng, 2ng, 0,5ng, 0,125ng gewählt wurden. In der Standardkurve (CT-Wert im Verhältnis zum log der Verdünnungsstufe) ließ sich die Effizienz über die Steigung berechnen (PCR-Effizienz 100% entspricht der Steigung 2).

B.10.4.3 Taqman-PCR mit experimentellen Proben

Die Taqman-PCR wurde mit cDNA-Proben der kommerziellen Normalgewebe, der Zelllinien und der mikrodisssezierten Tumor- und Normalgewebe durchgeführt. Der 25 μ l PCR-Ansatz setzte sich aus 1x PCR Master Mix und den optimierten Konzentrationen der Sonde (50nM-200nM) und Primer (50-900nM) zusammen. Für die Taqman-PCR

der Normalgewebe, Zelllinien und mikrodisssezierten Gewebe wurden 2ng cDNA-Template eingesetzt. Die Normierung aller experimentellen Proben erfolgte über die Referenzgene GAPDH und β -Aktin. Die Basislinie zur Bestimmung der CT-Werte wurde für alle Taqman-PCR Versuche auf 0,025 konstant gesetzt, um die Experimente untereinander vergleichen zu können.

B.10.5 Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse ist eine Methode zur Validierung von Tumorsuppressorgenen. Dabei sollen minimale Veränderungen wie Basensubstitutionen, kleine Deletionen und Insertionen nachgewiesen werden, die zum Verlust der Genfunktion führen können (Knudsen et al., 1971). Als Vorscreening stellt die SSCP ("Single-Strand Conformational Polymorphism") -Analyse eine schnelle und sensitive Methode dar, Veränderungen in PCR-amplifizierten DNA-Abschnitten nachzuweisen (Orita et al., 1989). Die PCR-Fragmente können fluoreszenzmarkiert und nach der Denaturierung der DNA durch die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) analysiert werden (Makino et al., 1992). Dabei bilden die DNA-Einzelstränge Sekundärstrukturen aus, die spezifisch für ihre Primärsequenz sind. Mutationen können aufgrund der Konformationsänderungen durch unterschiedliches Laufverhalten im Gel im Vergleich zur Wildtyp-DNA detektiert werden. Die Bildung der Sekundärstruktur und Auftrennung im Gel ist stark abhängig von variablen Bedingungen wie Temperatur und Ionenkonzentration während der Elektrophorese. Die Verifizierung der Veränderungen erfolgt durch Sequenzierung der auffälligen PCR-Fragmente des Kandidatengens.

In dieser Arbeit wurde ein potenzielles Tumorsuppressorgen (ELBT) in Brusttumoren untersucht. Erster Schritt war die Amplifikation der Exons des Kandidatengens (ELBT) durch flankierende Primer in Brusttumor-DNA-Proben. Die Markierung der PCR-Fragmente erfolgte anschließend in einem Post-PCR-Labeling-Verfahren durch den Einbau eines fluoreszenzgekoppelten Nukleotids mittels des Klenov-Enzyms (Inazuka et al., 1996). Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente wurde bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Nach der SSCP-Analyse wurden alle Tumor-DNA-Fragmente, die nach der Elektrophorese im Vergleich zur Wildtyp-DNA ein auffälliges Bandenmuster zeigten, nachsequenziert.

B.10.5.1 Herkunft der Brusttumor-DNA

Vom Universitätsklinikum Charité in Berlin wurden 71 Brusttumore zur Verfügung gestellt. 47 Tumore lagen als DNA-Proben vor, 24 Brusttumore wurden zuvor mikrodissiziert und die DNA anschließend isoliert. Der Großteil der Brusttumore (ca. 90%) waren invasiv duktales Karzinome.

B.10.5.2 PCR-Amplifikation von Tumor-DNA

Das in der Mutationsanalyse untersuchte Gen (ELBT) bestand aus acht Exons. Die Exons 2-8 konnten jeweils durch ein flankierendes Primerpaar in der intronischen Sequenz amplifiziert werden (Tab.8). Für das erste Exon war der 5'-Primer innerhalb des Exons lokalisiert, da zu diesem Zeitpunkt keine intronische Sequenz zur Verfügung stand. Es wurde die gesamte kodierende Region auf Mutationen untersucht. Die Optimierung der PCR erfolgte in einer Gradienten-PCR (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) mit zwei unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen.

Tab. 8: Primer zur Amplifikation der 8 Exons von ELBT. Am 5'-Ende der Primer wurde an die genspezifische Sequenz zusätzlich die Basen "ATT" angefügt, die zur Fluoreszenz-Markierung dienen.

ELBT	5'-Primer Sequenz	3'-Primer Sequenz	Produktgröße in bp
Exon 1	5'-ATTTTCAGCCATGAAGACCCTCATAG-3'	5'-ATTCTTCTCGCAGGTCCATAACC-3'	163
Exon 2	5'-ATTGAGAGAAGGGTGACAGTGG-3'	5'-ATTGACACTGCCTGCCACCT-3'	215
Exon 3	5'-ATTAAGCCCAGTAGGACCTGACC-3'	5'-ATTCTAGAATGAGAGGTGGGGCA-3'	187
Exon 4	5'-ATTCACCCCCACCAACTCTGTAT-3'	5'-ATTATTTCCACCCCTCCCAAAAC-3'	160
Exon 5	5'-ATTCTCTCCAGCCAGTTTCCTC-3'	5'-ATTCCTTGACAACAGTGCCAG-3'	292
Exon 6	5'-ATTCAACCCTGACTGTTGCGTC-3'	5'-ATTTGGAGGGGTGTGTGTGTGT-3'	244
Exon 7	5'-ATTGCCAGTAAGTAGGGTATGACAGA-3'	5'-ATTGTTCAAGACAGCCCTTGGT-3'	284
Exon 8	5'-ATTGGTGTGACTAACCAGAAGCCT-3'	5'-ATTATTTGCAGCTGGTTCCTCC-3'	244

Durchführung:

In einem 25µl Ansatz wurden 1xPCR-Puffer, 0,2mM dNTP, 0,2µM 3'-Primer, 0,2µM 5'-Primer, 2 Units Taq Polymerase, 15mM bzw. 40mM $MgCl_2$ (alle Life Technologies, Eggenstein) und 30ng Plazenta-DNA 35 Zyklen in einer Gradienten-PCR (94°C, 30sec; 50-70°C, 30sec; 72°C, 1min) amplifiziert. Im Falle unspezifischer Produkte wurde eine "Hot-Start"-PCR mit 2 Units AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (Perkin Elmer, Langen) durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im 2% Agarosegel. Von den Tumor-DNA-Proben wurden 50ng unter den optimierten PCR-Bedingungen amplifiziert. Als Wildtyp-Kontrolle wurde eine Plazenta-DNA eingesetzt.

B.10.5.3 Fluoreszenz-Markierung der PCR-Fragmente

Zur Detektion der PCR-Fragmente in der SSCP-Analyse wurden die PCR-Fragmente mit dem fluoreszenzgekoppelten Nukleotid R6G-dUTP durch die Klenov-Enzym-basierte 3'-Austauschreaktion markiert. Die Markierung erfolgte durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragmentes, wobei das letzte Nukleotid am 5'-Ende des Gegenstranges des PCR-Fragments durch R6G-DUTP ersetzt wurde. Um die Austauschreaktion zu erleichtern, wurden nach dem Adenin am 5'-Ende zwei Thymine als Abstandhalter in die Primer-Sequenz eingebaut. Das entsprechende Thymin auf dem Gegenstrang wurde gegen R6G-DUTP ausgetauscht. Bei der Markierungsreaktion wurden beide Stränge markiert.

Für die 10µl Post-PCR-Labeling-Reaktion wurden 5mM Tris-HCl (pH8,7), 10mM MgCl₂, 0,4µM R6G-dUTP (PE Applied Biosystems, Weiterstadt), 5 Units Klenow-Fragment (New England BioLabs, Frankfurt) und 5µl PCR-Fragment 30min bei 37°C inkubiert. In einem Multiplexansatz wurden bis zu drei PCR-Fragmente unterschiedlicher Exons in einem Markierungsansatz gepoolt. Durch Zugabe von 5mM EDTA und 3 Vol deionisiertem Formamid wurde die Reaktion abgestoppt. Die Analyse im SSCP-Gel erfolgte am selben Tag der Markierung.

B.10.5.4 SSCP-Analyse

Die fluoreszenz-markierten PCR-Fragmente wurden in einem 8%igen Poyacrylamidgel (AccuGelTM 40%, 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung, National Diagnostic, Atlanta, USA) mit 10% deionisiertem Formamid aufgetrennt. Dafür wurde 1µl Post-PCR-Labeling-Ansatz mit 0,4µl Rhodamin-markiertem DNA-Größenstandard GS500 und 0,6µl Dextran-Blue Stammlösung (Perkin Elmer, Langen) gemischt, bei 94°C denaturiert und anschließend bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte im Sequenzierautomat ABI PRISM 377 DNA (PE Applied Biosystem, Weiterstadt) unter gerätespezifischen Einstellungen (Elektrophoreseleistung 200W, Geltemperatur siehe unten, Laser-Leistung 40mW, Laufzeit 12h, CCD-Einstellung 250, CCD-Empfindlichkeit 2, CCD X Pixel Position 196). Die Geltemperatur wurde über ein externes Kühlgerät eingestellt und konstant gehalten, wobei alle PCR-Fragmente bei drei Geltemperaturen (15°C, 25°C und 30°C) aufgetrennt wurden. Die Analyse der Rohdaten des Sequenzierautomats erfolgte über die Software GeneScanTM 672 (PE) auf Basis der Laufstrecke der Fragmente. Der interne Standard GS500 wurde zur Größenbestimmung und Identifizierung der Fragmente im Multiplexansatz benutzt. Die

ausgegebenen Elektropherogramme stellten für jedes PCR-Fragment die Fluoreszenzintensität als Funktion der Laufzeit dar. Über den Vergleich der Elektropherogramme des Wildtyp-Fragmentes mit den PCR-Produkten der Tumor-DNA konnten die Fragmente identifiziert werden, die ein auffälliges Laufverhalten im Gel zeigten.

B.10.5.5 Sequenzierung auffälliger Fragmente

Die in der SSCP- Analyse auffällig gewordenen Exonfragmente wurden in einem 50µl PCR-Ansatz (B.10.6.2) amplifiziert, über eine kommerzielle Säule (QIAquick PCR Purification Kit) gereinigt und in 30µl TE-Puffer aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte mit 5µl gereinigtem PCR-Produkt wie in B.8.4 beschrieben. Anschließend wurden die sequenzierten Fragmente im gap4-Projekt mit der Wildtyp-Sequenz verglichen und nach möglichen Veränderungen in der Tumor-DNA untersucht.

B.11 RNA in-situ Hybridisierung

Die RNA in-situ Hybridisierung (ISH) erstmals beschrieben von Gall und Pardue (1969) sowie John et al (1969) wird zur qualitativen und semi-quantitativen Expressionanalyse eingesetzt. Bei dieser Methode werden genspezifische Nukleinsäure-Sequenzen in ihrer zellulären Umgebung visualisiert. Als Sonde können DNA und RNA Proben genutzt werden, die radioaktiv oder nicht-radioaktiv mit Digoxigenin (DIG), Biotin oder Fluorochromen markiert sind. In dieser Arbeit wurden RNA-Sonden eingesetzt, die über die in-vitro Transkription von genspezifischer cDNA generiert und DIG-markiert wurden (Holtke et al., 1990; Komminoth et al., 1992a,b). Bei der in-vitro Transkription konnten die T3-, T7- und SP6-Promotorsequenzen der Klonierungsvektoren genutzt werden (Dunn and Studier, 1983; Kassavetis et al., 1982). Im ersten Schritt wurde die Plasmid-DNA der cDNA-Klone linearisiert und durch die entsprechende RNA-Polymerase unter Einbau von Digoxigenin-markiertem dUTP in-vitro transkribiert. Dabei wurde neben der spezifischen Antisense-Sonde auch eine Sense-Sonde als Negativ-Kontrolle hergestellt. Die Hybridisierung erfolgte auf paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten, die zuvor mittels der Vorhybridisierung entparaffiniert, rehydriert und fixiert wurden. Die Detektion der Hybridisierung wurde durch die Bindung des alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-DIG-Antikörpers ermöglicht, der nach Zugabe des Substrates BM Purple eine blaue Präzipitation verursacht. Eine Überprüfung der Spezifität des Hybridisierungssignals wurde durch die zelluläre Lokalisation des Präzipitates und der Sense-Negativkontrolle ermöglicht.

B.11.1 Herkunft des Paraffingewebes

Die verwendeten paraffin-eingebetteten Tumor- und Normalgewebe wurden zusammen mit Informationen über die Histopathologie im Rahmen einer Kooperation von dem Universitätsklinikum Charité in Berlin zugesendet. Weitere Gewebearrays ("Multiple Tissue Arrays") wurden von der Firma Biocat GmbH, Heidelberg bezogen.

B.11.2 Präparation der RNA-Sonden

Für die Linearisierung der Antisense- und Senseprobe wurden 20µg Plasmid-DNA mit 20 Units Restriktionsenzym in Abhängigkeit vom Vektor 3h verdaut (Tab.9).

Tab. 9: Angaben der Restriktionsenzyme für die Linearisierung und der RNA-Polymerasen für die in-vitro Transkription in Abhängigkeit von den Vektoren.

Vektor	Linearisierung		RNA-Polymerase	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense
pT7T3D (-PAC)	EcoRI (Aval)	HindIII (NotI)	T3	T7
(p)Bluescript SK-	EcoRI (XbaI)	XhoI (PstI)	T7	T3

Die Aufreinigung des Linearisierungsansatzes erfolgte durch Zugabe von 1 Vol Phenol (Tris-gesättigt, pH8,0). Nach dem Mischen und Abzentrifugieren (12.000g, 5min, Rt) wurde der wässrige Überstand abgenommen, mit 1 Vol Chloroform vermischt und erneut wie oben abzentrifugiert. Der wässrige Überstand, welcher die gereinigte DNA enthält, wurde in 2,5 Vol absolutem Ethanol und 1/10 Vol 3M NaAc (pH7,0) 10min bei -80°C gefällt und abzentrifugiert (12.000g, 10min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 40µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Zur Konzentrationsabschätzung der linearisierten DNA wurden 1µl der Probe und 250ng DNA-Standard (MarkerIII, Roche Diagnostics, Mannheim) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, und die Konzentration über den Vergleich mit dem Standard abgeschätzt. Für die in-vitro Transkription wurde 1µg linearisierte DNA in einem 20µl-Ansatz mit 2µl DIG RNA Labeling Mix (je 10mM ATP,CTP,GTP, 6,5mM UTP, 3,5mM DIG-UTP in Tris-HCl, pH7,5), 2µl 10xTranscription Puffer (400mM Tris-HCl, pH8,0, 60mM MgCl₂, 100mM DTE, 20mM Spermidine, 100mM NaCl, 1 Unit/ml RNase Inhibitor), 16 Units RNase Inhibitor und 16 Units RNA-Polymerase für 3h bei 37°C inkubiert (alle Reagenzien von Roche, Mannheim). Die RNA wurde anschließend durch Zugabe von 2,5µl 4M LiCl und 75µl absolutem Ethanol 10min bei -80°C gefällt und abzentrifugiert (12.000g, 30min, 4°C). Die gefällte RNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5min luftgetrocknet und in 50µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Die Kontrolle der in-vitro

transkribierten RNA erfolgte im 0,7% Agarose-RNA-Gel (in 1xMOPS-Puffer mit 1% Formaldehyd). Dabei wurde 1µl RNA mit 40% Formamid, 6% Formaldehyd, 400ng in 1xMOPS-Puffer vermischt, 10min bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt. Die Proben wurden neben einem RNA-Größenstandard mit 1/6 Vol RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol) versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die gesamte RNA wurde in 1/20 Vol Hybridisierungslösung (siehe Anhang G1) aufgenommen und bei –20°C gelagert.

B.11.3Hybridisierung der Paraffinschnitte

Bei der Vorhybridisierung der paraffinierten Gewebe wurden die Schnitte durch Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zwei Inkubations-schritte mit Paraformaldehyd (PFA) dienten der Fixierung der Gewebestrukturen, während durch die Proteinase-K-Behandlung das Gewebe angedaut und für die anschließende Hybridisierung mit der RNA-Sonde zugänglich gemacht werden sollte. Die Inkubations-schritte der Vorhybridisierung wurden in gebackenen Küvetten durchgeführt. Alle anzusetzenden Lösungen (mit Ausnahme von Tris-Puffern) wurden mit 0,1% DEPC versetzt und sterilfiltriert.

Vorhybridisierung:

Die Präparate wurden dreimal 10min in Xylol entparaffiniert. Die Rehydrierung erfolgte zweimal 5min in absolutem Ethanol und anschließenden einminütigen Inkubations-schritten in absteigenden Ethanol-Konzentrationen (95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%). Die Präparate wurden zweimal 5min in 1xPBS gewaschen, 30min in 4% PFA fixiert und wiederholt zweimal 5min in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in Proteinase K-Puffer (10µg/ml Proteinase K) 10min inkubiert und erneut zweimal in 1xPBS gewaschen. Es erfolgte ein erneuter Fixationsschritt 30min in 4% PFA mit weiteren Inkubationen 5min in 1xPBS und zweimal 2min in 2xSSC. Bis zur Hybridisierung mit der Sonde inkubierten die Schnitte mindestens 30min in Tris-Glycin-Puffer.

Hybridisierung der RNA-Sonde:

Vor der Sonden-Hybridisierung wurde die überschüssige Flüssigkeit von den Gewebeschnitten entfernt und die Objektträger mit der Schnittfläche nach oben in eine 4-Well-Schale gelegt. Die Schnitte wurden mit 100µl Hybridisierungslösung (2,5ng/µl RNA-Sonde) versetzt, wobei die Flüssigkeit durch ein Parafilm-Streifen auf dem Präparat verteilt und abgedeckt wurde. Die Hybridisierung erfolgte 12h bei 65°C in einer

feuchten Kammer. Anschließend wurden die Präparate in Küvetten überführt. Nach dreimaligem Waschen für je 20min in 5xSSC bei Rt wurden die Präparate 40min bei 60°C in Formamid-Waschlösung (20% Formamid, 0,5xSSC) inkubiert. Die Formamid-Waschlösung wurde einmal gewechselt und sehr langsam (über ca. 1,5h) auf 37°C abkühlt. Es folgte ein Waschschrift für 15min bei 37°C in NTE-Puffer (0,5M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7,0, 0,5mM EDTA). Die nicht-gebundene RNA wurde im nächsten Waschschrift 30min bei 37°C in NTE-Puffer mit RNase A (10µg/ml) abgebaut und die Präparate anschließend erneut in NTE-Puffer für 15min bei 37°C gewaschen. Es folgte ein wiederholter Waschschrift in Formamid-Waschlösung 40min bei 60°C und eine zweimalige Inkubation in 2xSSC für 15min bei Rt.

Antikörper-Inkubation:

Vor der Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte 1h in 1% Blocking-Lösung (1% Blocking Reagent, Roche, Mannheim, in 0,1M Maleinsäure-Puffer) inkubiert. Die Hybridisierung der Präparate erfolgte mit dem Anti-DIG-Antikörper (Roche; 1:2000 verdünnt in 1% Blocking-Reagent) 12h bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Präparate wurden anschließend dreimal 10min und zweimal 1h in 1xTBST-Puffer (1xTBS mit 0,1% Tween-20), und dreimal 10min in NTMT-Puffer (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH9,5, 50mM MgCl₂, 0,1% Tween-20) gewaschen.

Detektion und Gegenfärbung:

Für die Detektion des Hybridisierungssignals wurden die Schnitte in 1ml BM-Purple (Roche) mit 2mM Levamisol und 0,1% Tween-20 bei Rt (schnelle Reaktion) oder 4°C (langsame Reaktion) inkubiert und je nach Färbereaktion zweimal täglich gewechselt. Die Färbedauer betrug in der Regel bis zu vier Tage, wobei die Reaktion unter dem Binokular kontrolliert wurde. Bei gut sichtbarem Signal wurden die Präparate dreimal 10min in NTMT-Puffer gewaschen und mit 0,1% Kernechtrot-Lösung 10min gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

C Ergebnisse

C.1 Validierung der in-silico Expressionsanalyse

C.1.1 Auswertung des elektronischen Northern

Grundlage dieser Arbeit war die in-silico Expressionsanalyse von Genen durch die Nutzung von EST-Bibliotheken, die aus verschiedenen Normal- und Tumorgeweben generiert wurden. Der daraus resultierende elektronische Northern zu jedem Gen gab Aufschluss über das Expressionsmuster in den Geweben und den korrespondierenden Tumoren, wobei die signifikante differenzielle Expression hinsichtlich Brust- und Ovarialgewebe Auswahlkriterium für die weitere Validierung potenziell tumorassoziierter Gene war. Der elektronische Northern zeigt am Beispiel des Gens YAP65 ("Yes-Associated Protein", 65kDa) die Verteilung der über AUTEX identifizierten ESTs aus den cDNA-Datenbanken von 23 Organen und Zelltypen bzw. ihren korrespondierenden Tumoren (Tab.10).

Tab. 10: Elektronischer Northern von YAP65

Gewebetyp	Normalgewebe		Tumorgewebe		Verhältnis T/N	P-Wert α	Signifikanz in %
	Treffer	Bibliotheks-Größe	Treffer	Bibliotheks-Größe			
Blase	2	25641	2	42550	0.60	0.635	36.5
Blut-Leukozyten	0	130844	0	941	-	-	-
Brust	26	120725	6	67582	0.41	0.0437	95.6
B-Zell-Lymphom	1	108530	0	7357	-	1	0.0
Dickdarm	3	31042	4	35626	2.38	0.259	74.1
Dünndarm	3	36432	2	9379	2.56	0.272	72.8
Endometrium	3	18977	2	6023	2.08	0.6	40.0
Gehirn	1	110439	4	38567	11.11	0.0178	98.2
Haut	2	27182	0	1180	-	1	0.0
Herz	9	98496	0	7271	-	1	-0.0
Hoden	2	29540	0	16891	-	0.537	46.3
Leber	1	21521	1	15763	1.37	1	-
Lunge	8	96193	4	43114	1.11	1	0.0
Magen-Speiseröhre	0	13799	0	12119	-	-	-
Myometrium	10	35843	0	14713	-	0.0409	95.9
Nebenniere	0	25886	0	20230	-	-	-
Niere	3	44566	1	40078	0.37	0.627	37.3
Ovar	4	33687	7	41736	1.41	0.764	23.6
Pankreas	0	65807	0	21808	-	-	-
Prostata	7	88661	4	76762	0.66	0.56	44.0
Skelettmuskel	1	58315	1	27063	2.17	0.533	46.7
Squamöse Zellen	4	33833	3	25706	0.99	1	0.0
T-Zell-Lymphom	1	60680	0	17313	-	1	-0.0

In den Brustgewebe-Bibliotheken ergaben sich für YAP65 im Normalgewebe 26 ESTs (Treffer) gegenüber 6 ESTs im Tumorgewebe. Die Bibliotheksgröße der einzelnen Gewebe und entsprechenden Tumore wurde durch die EST-Gesamtzahl aller gepoolten cDNA-Datenbanken eines Gewebetyps bestimmt. Um relative Expressionswerte der Gene zu analysieren und dadurch die differenzielle Expression zu ermitteln, wurden die EST-Treffer in Abhängigkeit zur Bibliotheksgröße ausgewertet. Das Verhältnis Tumor zu Normalgewebe (T/N) zeigte bei YAP65 eine schwächere Expression im Brusttumor ($T/N < 1$) verglichen mit dem Brustnormalgewebe oder eine stärkere Expression im Hirntumor ($T/N > 1$) verglichen mit normalem glialen Gewebe. Die Signifikanz dieser differenziellen Expression ergab sich nach der Auswertung durch den Fisher Exact Test. Als Signifikanzschwelle wurde ein P-Wert $\alpha < 0,1$ bzw. ein Signifikanzwert von über 90% angesetzt. Bei YAP65 war diese Signifikanzschwelle im Falle der differenziellen Expression in Brustgewebe ($\alpha = 0,0437$; 95,6%) erfüllt, so dass der elektronische Northern auf eine mögliche Involvierung von YAP65 in die Entstehung bzw. Progression des Brustkarzinoms hindeutete.

C.1.2 Bestätigung der in-silico Expressionsdaten

Zur Verifizierung des elektronischen Northern wurde das in-silico generierte Expressionsmuster mit den experimentellen Expressionsdaten aus den Northernblot- und cDNA-Array-Experimenten verglichen. Exemplarisch wurde dieser Vergleich für zwei durch diesen Ansatz identifizierte Kandidatengene, YAP65 und ein putatives Calpain, dargestellt. Der elektronische Northern beinhaltet neben dem Expressionsverhältnis von Normal- und Tumorgewebe Informationen über die Gewebespezifität des untersuchten Gens. Im experimentellen Teil der Arbeit wurde das Expressionsmuster von YAP65 und dem putativen Calpain in 16 verschiedenen Normalgeweben mit Hilfe des Northernblots bestimmt. Zur besseren Darstellung des Vergleichs der Expressionsdaten des in-silico Ansatzes und des Northernblots wurde der elektronische Northern auf 13 äquivalente Normalgewebe reduziert, wobei die Anzahl der ESTs von YAP65 und dem putativen Calpain in den einzelnen Geweben auf eine konstante Bibliotheksgröße (Treffer/ 100.000 ESTs) umgerechnet wurde (Abb.9). Die drei Gewebe Milz, Thymus und Plazenta des Northernblots waren im elektronischen Northern nicht vertreten und konnten für diese Validierung nicht herangezogen werden. Die 13 Gewebe sind hinsichtlich der Expressionsstärke von YAP65 im elektronischen Northern absteigend aufgelistet. Beide Expressionsexperimente zeigen ein nahezu

ubiquitäres Vorkommen von YAP65. Die starke Expression von YAP65 in den cDNA-Bibliotheken des Ovars und des Herzes im elektronischen Northern bestätigte sich im Northernblot. Die schwache Expression von YAP65 in Gehirn und die nicht vorhandenen ESTs in den peripheren Blutleukozyten stellten sich auch in den Expressionsdaten des Northernblots dar. Bei den moderat exprimierenden Geweben waren mit wenigen Ausnahmen, wie Dickdarm und Pankreas, ähnliche Tendenzen des Expressionsmusters von YAP65 festzustellen. Mit dem Gen YAP65 wurde die Verifizierung des elektronischen Northern am Beispiel eines ubiquitär exprimierten Gens dargestellt. Eine Korrelation der Expressionsdaten war in diesen Fällen bei größeren quantitativen Unterschieden signifikant.

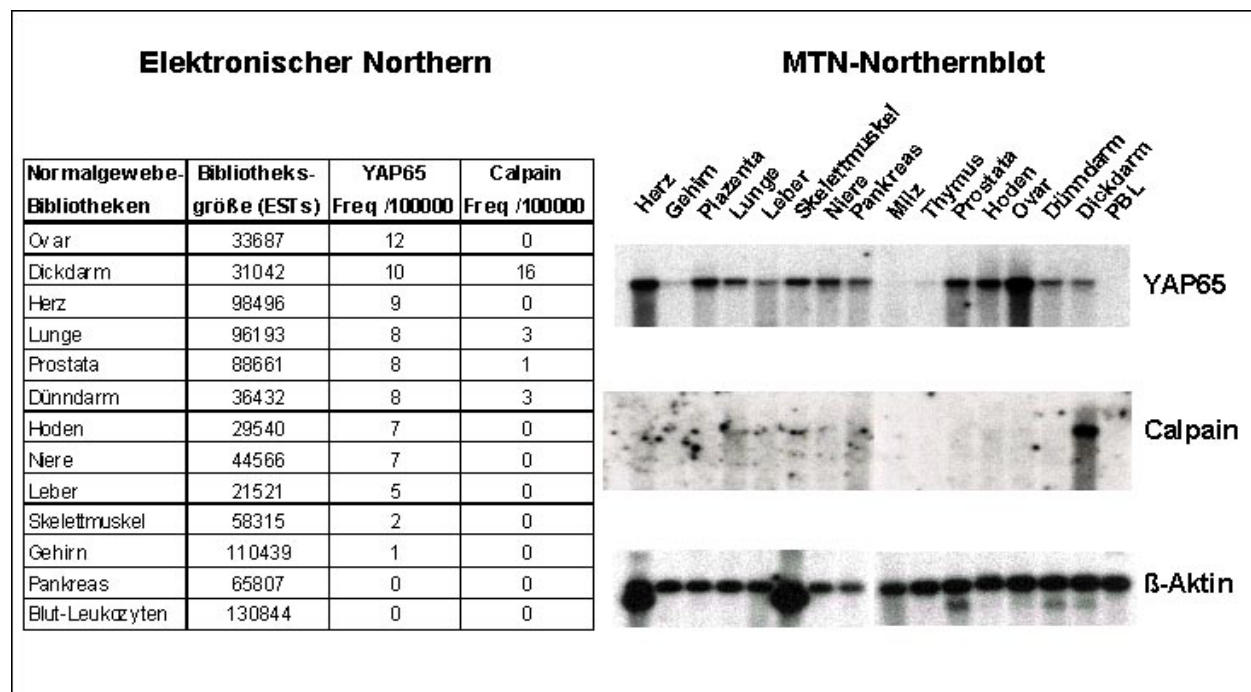


Abb.9: Vergleich der Expression von YAP65 und dem putativen Calpain in verschiedenen Normalgeweben zwischen elektronischem Northern (Tabelle) und MTN-Northernblot. Im elektronischen Northern beziehen sich die EST-Zahlen der Gene, die die Expressionstärke in den Geweben repräsentieren, auf eine definierte Bibliotheksgröße von 100.000 ESTs (Freq/100.000). Zur Quantifizierung der Gewebe des Northernblots ist die Hybridisierung mit β-Aktin dargestellt.

Bei dem putativen Calpain zeigte der elektronischen Northern eine sehr gewebespezifische Expression besonders in Dickdarm (16/100.000ESTs) und sehr schwach in Dünndarm, Lunge und Prostata (Abb.9). Der MTN-Northernblot bestätigte die spezifische, sehr starke Expression im Dickdarm und zeigte darüber hinaus wie im elektronischen Northern eine schwache Expression in der Lunge. Die identifizierten ESTs des elektronischen Northern im Dünndarm und Prostata wurden nicht bestätigt. Die Verifizierung des elektronischen Northern war in großem Maße abhängig von der

Bibliotheksgroße der beteiligten Gewebe. Je größer die Gesamtzahl der ESTs für ein Gewebe, desto repräsentativer die Anzahl der ESTs eines spezifischen Gens bezogen auf die relative Expression zu anderen Geweben.

Die Gene YAP65 und das putative Calpain wurden aufgrund der in-silico differenziellen Expression in Brust- bzw. Ovarialtumoren identifiziert. Zur Verifizierung der Expressionunterschiede zwischen den Normalgeweben und den korrespondierenden Tumoren erfolgte der Vergleich mit einem radioaktiv markierten cDNA-Array. Auf dem cDNA-Array waren zu verschiedenen Geweben sowohl Normalgewebe als auch Tumorgewebe von Patienten repräsentiert (Brusttumoren: Nr.1, 3, 5, 6, 7, 9: IDCs; Nr.2: ILC; Nr.4: medullär; Nr.8: mucinös; Ovartumore: Nr.1-3: Adenokarzinome; Nr.1: serös; Nr.3: papillär). In der Gegenüberstellung wurde der elektronische Northern und der cDNA-Array auf die Gewebe Brust und Ovar reduziert, für die in dieser Arbeit tumorassoziierte Gene untersucht wurden (Abb.10).

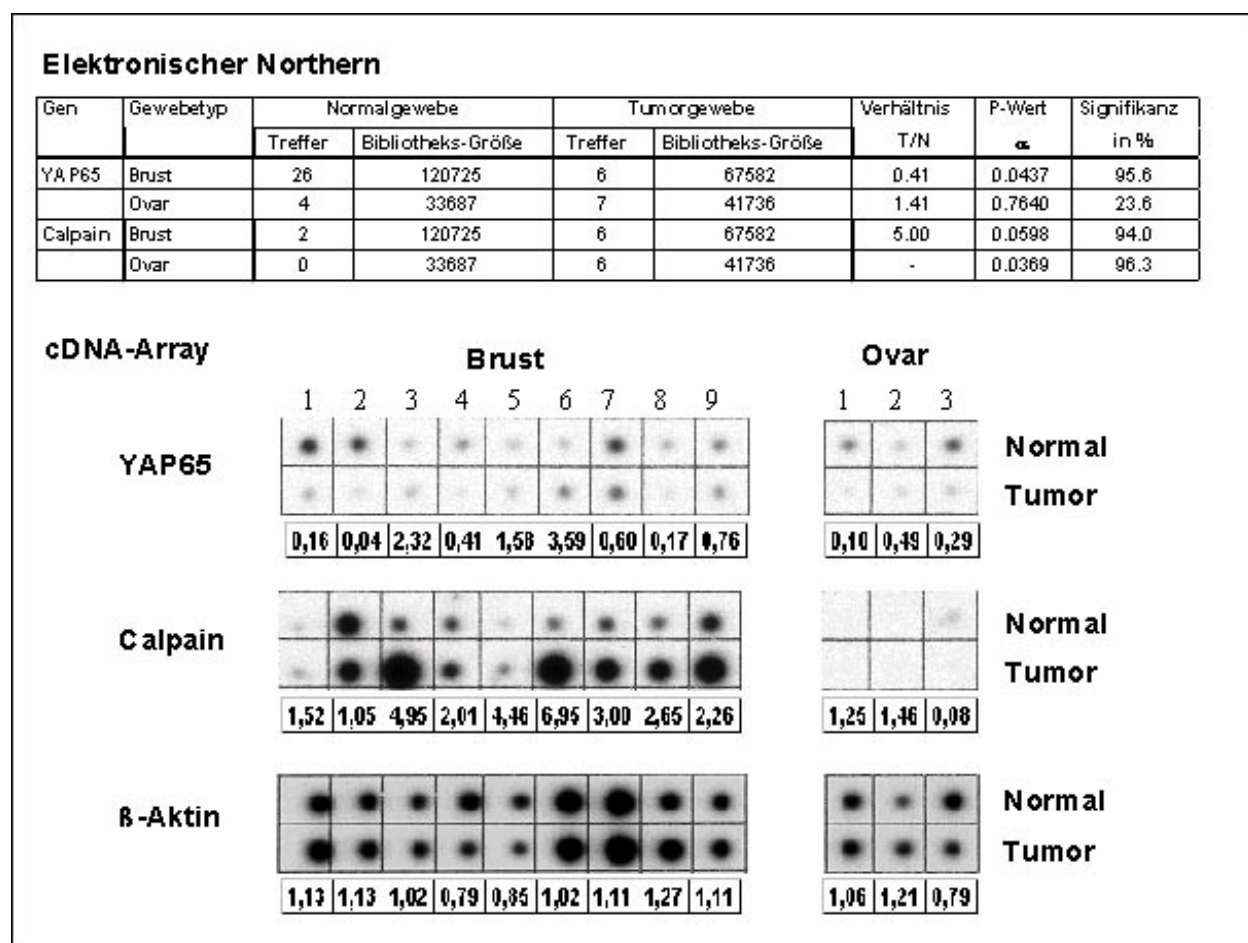


Abb.10: Vergleich der differentiellen Expression von YAP65 und dem putativen Calpain in Brust- und Ovarialtumoren zwischen den Methoden des elektronischen Northern und des radioaktiv markiertem cDNA-Arrays. Die Werte unter den cDNA-Arrays geben die densitometrisch ermittelten Expressionsverhältnisse (T/N) der Probenpaare wieder, die zuvor auf die β -Aktin-Expression normiert wurden.

Die verringerte Expression von YAP65 im Brusttumor (T/N=0,41) des elektronischen Northern bestätigte sich bei vier der neun Probenpaare (Nr.1, 2, 4, 8; T/N<0,5) auf dem cDNA-Array. In den Ovarialtumorproben des cDNA-Arrays zeigte sich ebenfalls in allen drei Fällen (Nr.1, 2, 3; T/N<0,5) eine verringerte Expression im Tumorgewebe, wobei der elektronische Northern auf keine entsprechende differenzielle Expression hindeutete. Im Unterschied zu den gepoolten cDNA-Bibliotheken aus den Geweben (Tumor/Normal) mehrerer Patientinnen als Grundlage des elektronischen Northern, beziehen sich die visualisierten Expressionssignale des cDNA-Arrays auf das Gewebe einer Patientin. Der cDNA-Array gibt daher individuelle Expressionsunterschiede eines Gens zwischen verschiedenen Patientinnen und Geweben unterschiedlicher Histologie wieder, die sich in der Inhomogenität der Expressionsdaten widerspiegeln. Die Ergebnisse der beiden Expressionsexperimente zeigten das Gen YAP65 in den untersuchten Tumoren herunterreguliert und lassen auf eine mögliche Tumorassoziation schließen.

Im Falle des putativen Calpains zeigte der elektronische Northern eine signifikant verstärkte Expression in Brusttumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe (T/N=5,0) und ähnliche Verhältnisse hinsichtlich des Ovargewebes. Es bestätigte sich auf dem cDNA-Array in sieben der neun Gewebepaare für Brust (Nr. 3-9; T/N>2) eine verstärkte Expression des Calpains in den Tumorproben, von denen drei Probenpaare (Nr.3, 5, 6; T/N>4) eine ähnlich hohe differenzielle Expression zeigten wie im elektronischen Northern. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass die Expression des putativen Calpains im Brusttumor gegenüber dem Normalgewebe hochreguliert ist. Die in-silico differenzielle Expression im Ovargewebe wurde mittels des cDNA-Arrays nicht bestätigt, wobei sich bei allen drei Gewebepaaren keine Expression des Calpains nachweisen ließ.

Der elektronische Northern stellte sich als schnelle und verifizierbare Methode dar, über die Analyse der differenziellen Expression potenzielle tumorassoziierte Gene zu identifizieren.

C.2 Kartierung von 330 in-silico Kandidatengenen für gynäkologische Tumore

Nach der genomweiten in-silico Expressionsanalyse für die gynäkologischen Tumore der Ursprungsgewebe Brust, Ovar, Endometrium und Myometrium ergaben sich insgesamt 457 putative Gene, die nach dem elektronischen Northern in mindestens einem der genannten gynäkologischen Tumore differenziell exprimiert waren. Die 457 in-silico differenziell exprimierten Gene repräsentieren ein nicht-redundantes Set von 330 Kandidatengenen, die mittels der elektronischen PCR und des Radiation Hybrid Mappings chromosomal kartiert wurden (Dahl et al., 1999; Abstract). Die chromosomale Verteilung dieser Kandidatengene wurde anschließend mit bereits beschriebenen aberranten Regionen für die gynäkologischen Tumore verglichen (Abb.11.1/.2). Dabei zeigten sich die potenziell tumorassoziierten Gene nicht zufällig über das menschliche Genom verteilt. Ein große Zahl von Kandidatengenen wurde in chromosomale Regionen kartiert, die in LOH- und Amplifikationsstudien für gynäkologische Tumore häufig als aberrant beschrieben wurden. Beispielsweise in den häufig deletierten Regionen 1p36-p31, 3p21-p14, 6q21-q27, 7q11-q31, 10q23-q26, 11p15, 11q12-q23, 13q21, 17q und 22q sowie in den häufig amplifizierten Regionen 1q32-q41, 8q, 11q, 17q und 20q wurden über 120 in-silico Kandidatengene lokalisiert, die neben bereits bekannten tumorassoziierten Genen neue potenzielle Zielgene für die Tumorentstehung oder Tumorprogression darstellen. In mehreren chromosomalen Regionen wie 1q21-q22, 1q32-q41, 6q21, 7q11, 8p12, 9q34, 10q26, 11p15, 11q12-q23, 19q13, 20q13, 21q22, 22q12-q13 sind signifikante Anhäufungen von Kandidatengenen zu beobachten, die zur weiteren Charakterisierung als besonders interessant erscheinen. Die Kartierung der in-silico Kandidatengene stellt zusammen mit dem Vergleich von beschriebenen chromosomalen Aberrationen die Grundlage für eine Vielzahl möglicher Projekte zur Evaluierung von tumorassoziierten Genen und Proteinen dar. Für diese Arbeit erfolgte eine Auswahl der Kandidatengene aus den chromosomalen Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23. Beide Chromosomenabschnitte zeigen signifikante Anhäufungen von in-silico Kandidatengenen und stellen für Brust- und Ovarialkarzinome häufig als aberrant beschriebene Regionen dar, in denen noch unbekannte tumorassoziierte Gene vermutet werden. Die gesamte Kartierungsübersicht soll ausschließlich die Vorgehensweise in dieser Arbeit demonstrieren. Detaillierte Angaben zu den verschlüsselten Genen der anderen chromosomalen Bereiche sind in der Arbeit nicht enthalten.

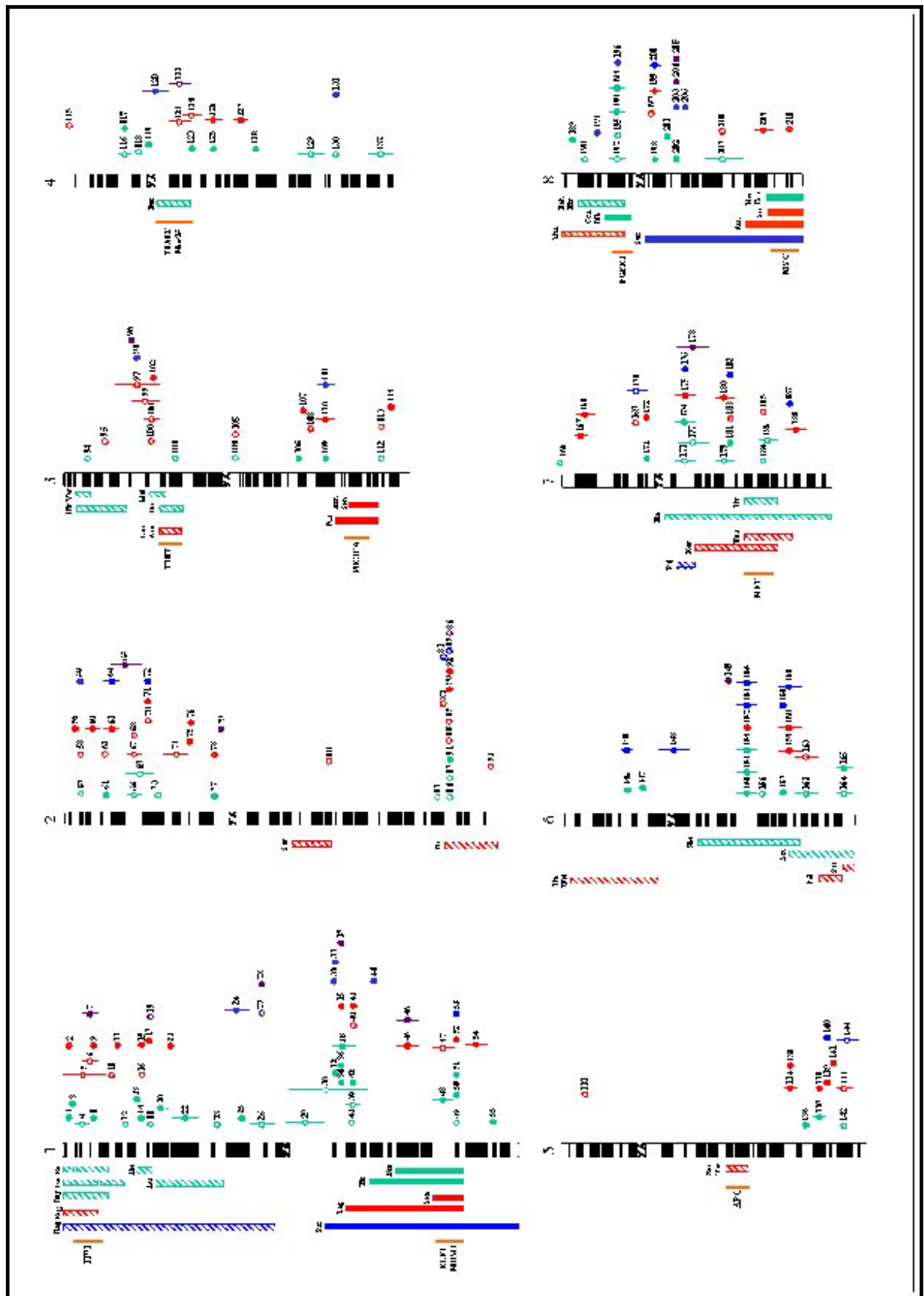


Abb.11.1: Teil 1 der Übersicht über die chromosomale Verteilung von 330 Kandidatengenen für gynäkologische Tumore im Vergleich mit beschriebenen Aberrationen.

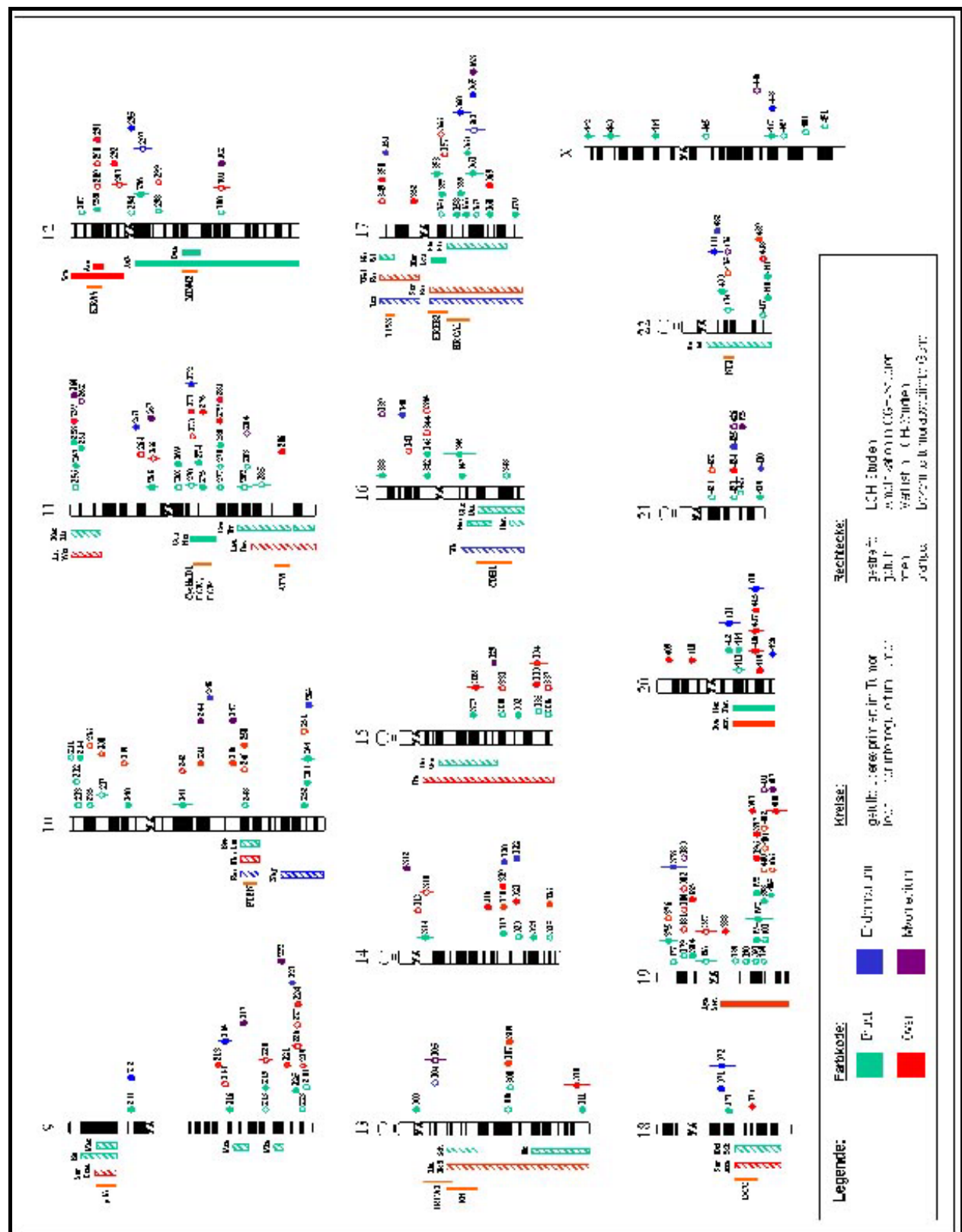


Abb.11.2: Teil 2 der Übersicht über die chromosomale Verteilung von 330 Kandidatengenen für gynäkologische Tumore im Vergleich mit beschriebenen Aberrationen. Die Literaturhinweise sind im Anhang nach den Chromosomen geordnet (G.3, Tab.27) wiedergegeben. Die Legende gibt Auskunft über Expressionscharakter der Gene für die entsprechenden Gewebe.

C.3 Beschreibung der Kandidatengene in 11q12-q23

C.3.1 Validierung aller in-silico Kandidatengene in 11q12-q23

Aus dem genomweiten Ansatz der in-silico Expressionsanalyse für gynäkologische Tumore wurden nach der chromosomalen Kartierung neun Gene in der Region 11q12-q23 identifiziert. Die Annotation der assemblierten Sequenzen nach der AUTEX-Analyse gegen die Nuklein- und Proteindatenbank ergab für alle neun Gene Identitäten zu entsprechenden Datenbankeinträgen (Tab.11).

Tab. 11: Beschreibung der in-silico differenziellen Gene aus der chromosomalen Region 11q12-q23.
*Der Name ELBT wurde für ein während dieser Arbeit noch unbekanntes Gen vergeben (aktueller Datenbankeintrag Stand Oktober 2001: DGAT2).

Gene in 11q12-q23	Gene Abkürzung	Genbank Eintrag	Funktion	Referenz
GS1999full (LOC84649)	ELBT *	gi14211870	unbekannt	
Frizzled homolog 4	FZD4	gi6912383	Aktivierung des wnt-Signalweges	Kirikoshi et al., 1999; Sagara et al., 2001
CD20-like precursor (LOC64166)	MS4A6A	gi11641258	unbekannt	Liang et al., 2001
Yes-associated protein 1, 65kDa	YAP65	gi5174750	Transkriptions-Co-Aktivator mit WW1-und SH3-Domäne; bindet p53-Bindungsproteine	Sudol et al., 1995; Yagi et al., 1999; Espanel et al., 2001
Death associated protein 4	DAP4	gi9886758	Homologie zu P52rIPK; Regulation der doppelsträngigen RNA-aktivierten Protein Kinase	Gale et al., 1998
CGI-85 protein	CGI-85	gi7705794	unbekannt	Lai et al., 2000
Chloride channel, nucleotide-sensitive, 1°	CLNS1A	gi4502890	Regulation des Zellvolumens	Nagl et al., 1995; Buyse et al., 1996
FBR-MuSV associated ubiquitously expressed gene	FAU	gi31302	Fusionsprotein FAU besteht aus ribosomalen Protein S30 und Ubiquitin-ähnlichem Protein	Kas et al., 1992; Michiels et al., 1993
SYT interacting protein SIP	SIP	gi3746786	Interaktion mit SYT als transkriptioneller Co-Aktivator	Brett et al., 1997

Für die Gene FZD4, YAP65, DAP4, CLNS1A, FAU und SIP wurden in der Literatur potenzielle Funktionen der Proteine beschrieben. Zu den Genen MS4A6A und CGI-85 waren ausschließlich die Sequenzen annotiert ohne Aussagen über mögliche Funktionen der Proteine. MS4A6A zeigte schwache Homologien zu dem Glykoprotein CD20, während das humane Gen CGI-85 über die komparative Genomanalyse zu *C.elegans* identifiziert wurde. Das in dieser Arbeit als ELBT ("Expressed in Liver, Breast and Testis") benannte Gen zeigte Sequenzidentitäten zu einem Genbankeintrag ("GS1999full") mit Abweichungen am 5'-Ende des Gens. Die Kartierung der Gene erfolgte über Radiation Hybrid Mapping und der elektronischen PCR (Tab.12). Die

daraus resultierenden STS-Marker wurden zu Beginn der Arbeit mit Hilfe der genomischen Datenbank (Genome Database GDB, NCBI) in die Region 11q12-q23 genetisch kartiert. Zum Ende dieser Arbeit wurde die chromosomale Lokalisation der STS-Marker und Gene nach der physikalischen Karte der annotierten genomischen Sequenzdatenbank (UCSC) aktualisiert.

Tab. 12: Allgemeine Angaben zu den Genen in 11q12-q23 und Ergebnisse der chromosomalen Kartierung über Radiation Hybrid Mapping (RHdb) mit Angabe der Wahrscheinlichkeit (LOD_Score), des statistisch ermittelten Abstandes (cRs) und der zytogenetischen Bande nach der genomischen Datenbank (GDB) bzw. der aktuellen genomischen Sequenzdatenbank (UCSC).

Gene in 11q12-q23	Assembly in bp	Transkript in bp	Protein in aa	Chromosomale Kartierung				
				RHdb / ePCR	LOD_Score	Abstand in cRs	GDB (08/1998)	
<i>ELBT</i> *	2408	2,4	388	SHGC-32865	1000	0	11q14.1	11q13.5
<i>FZD4</i>	1388	7,4	537	SHGC-20692	11.3	14	11q14.2-q14.3	11q14.2
<i>MS4A6A</i>	1679	1,5 (SV)	225	SHGC-35409	17.5	5.6	11q12.1-q13.1	11q12.3
<i>YAP65</i>	5132	5,2	454	D11S1339	1000	0	11q21.1-q22.3	11q22.1
<i>DAP4</i>	3275	4,2	761	SHGC-31396	10.4	6	11q13.5-q14.1	11q13.5
<i>CGI-85</i>	1574	2,8 (SV)	384	SHGC-14407	8.6	21	11q13.2-q13.5	11q13.4
<i>CLNS1A</i>	1427	1,5	237	SHGC-20692	11.3	14	11q14.2	11q14.1
<i>FAU</i>	598	0,5	133	RH76564	-	-	11q13.2	11q13.2
<i>SIP</i>	2913	2,8	669	SHGC-11846	-	-	11q13.3	11q13.3

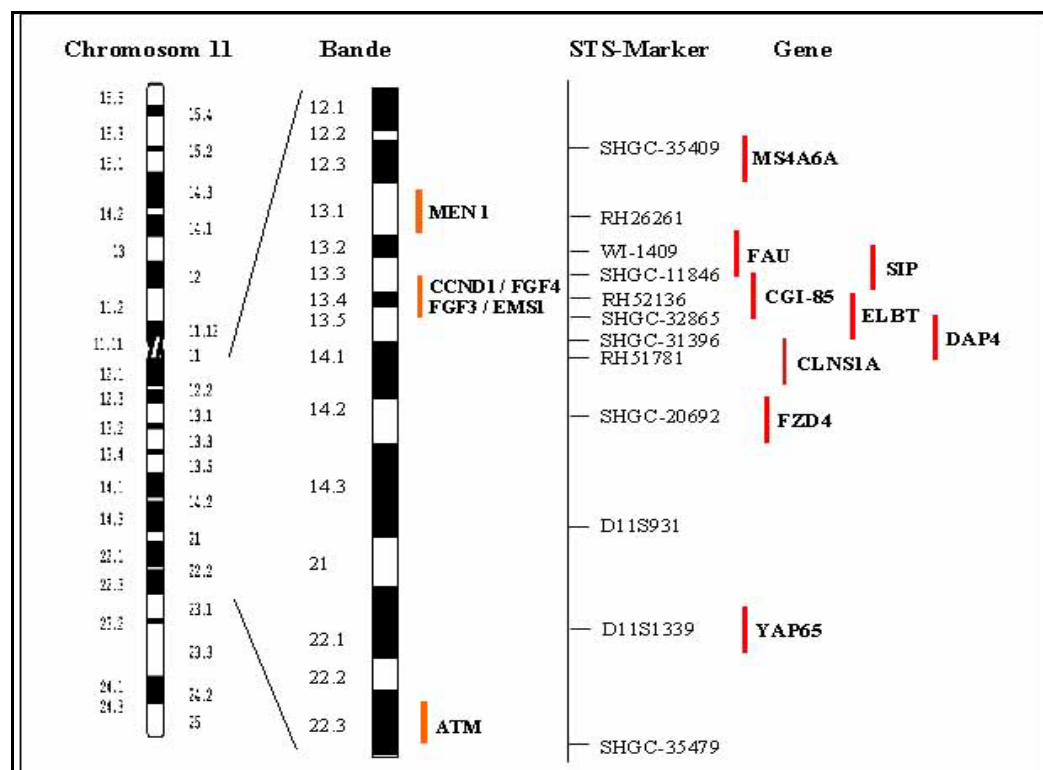


Abb.12: Cytogenetische Lokalisation der Kandidatengene in 11q12-q23. Die in-silico differenziell exprimierten Genen (rechte Spalte) wurden entsprechend der annotierten Genomdatenbank (UCSC) chromosomal kartiert. Dazu sind schon beschriebene tumorassoziierte Gene wie *MEN1*, *CCND1*, *FGF4*, *FGF3*, *EMS1* (11q13 Amplikon) und *ATM* angegeben.

Die meisten der untersuchten Gene wurden in den chromosomalen Abschnitt 11q13-q14 kartiert, einer Region, die genomisch in verschiedenen Tumoren häufig als aberrant beschrieben wurde. Die Gene FAU, SIP und CGI-85 waren in der Nähe des 11q13-Amplikons lokalisiert, das in gynäkologischen Tumoren häufig amplifiziert ist. Das Gen YAP65 wurde in dieser Arbeit in die chromosomale Region 11q22.1 kartiert, wobei in der Literatur 11q13 als Genlocus für YAP65 beschrieben wurde. Die untersuchten neun Gene waren nach der Expressionsanalyse des elektronischen Northern hinsichtlich Brust- oder Ovarialtumoren signifikant differenziell exprimiert (Tab.13).

Tab. 13: Ergebnisse des elektronischen Northern der Gene in 11q12-q23 bezüglich der differentiellen Expression in Brust- und Ovarialgewebe.

Gene in 11q12-q23	Gewebetyp	Normalgewebe		Tumorgewebe		Verhältnis T/N	P-Wert α	Signifikanz in %
		Treffer	Bibliothek-Größe	Treffer	Bibliothek-Größe			
ELBT	Brust	24	120725	3	67582	0.22	0.00772	99.2
	Ovar	0	33687	0	41736	-	-	-
FZD4	Brust	14	120725	1	67582	0.13	0.0155	98.5
	Ovar	0	33687	1	41736	-	1	-0.0
MS4A6A	Brust	14	120725	1	67582	0.13	0.0155	98.5
	Ovar	0	33687	6	41736	-	0.0366	96.3
YAP65	Brust	26	120725	6	67582	0.41	0.0437	95.6
	Ovar	4	33687	7	41736	1.41	0.764	23.6
DAP4	Brust	10	120725	0	67582	-	0.017	98.3
	Ovar	0	33687	21	41736	-	0.00055	99.9
CGI-85	Brust	2	120725	1	67582	0.89	1	0.0
	Ovar	0	33687	6	41736	-	0.0366	96.3
CLNS1A	Brust	18	120725	22	67582	2.17	0.0197	98.0
	Ovar	2	33687	15	41736	5.88	0.00612	99.4
Fau	Brust	4	120725	11	67582	5.00	0.0048	99.5
	Ovar	2	33687	11	41736	4.35	0.0476	95.2
SIP	Brust	3	120725	6	67582	3.57	0.0786	92.1
	Ovar	1	33687	8	41736	6.67	0.0488	95.1

Die Gene ELBT, FZD4, MS4A6A, YAP65, DAP4 waren in Brusttumoren signifikant geringer exprimiert gegenüber den Bibliotheken des Brust-Normalgewebes. Die Gene CLNS1A, FAU und SIP zeigten sich sowohl in Brusttumoren als auch in Ovarialtumoren signifikant überexprimiert gegenüber den Normalgeweben. Für das Gen CGI-85 ergab sich im elektronischen Northern in Ovarialtumor-Bibliotheken eine Überexpression. Damit wurden in der Region 11q12-q23 Kandidatengene für die Entstehung und Progression dieser Tumore identifiziert. Zur weiteren Charakterisierung und der Verifizierung der differentiellen Expression wurden die Gene über Northernblot- und cDNA-Array-Analysen untersucht. Für acht von neun Genen wurde die generierten cDNA-Sonde im MTN-Northernblot auf ihre Spezifität getestet. Für das Gen CLNS1A

Bis auf die Gene ELBT und CGI-85 waren alle untersuchten Gene ubiquitär exprimiert. Die Gene MS4A6A und CGI-85 zeigten neben dem angegebenen Haupttranskript weitere Spleissvarianten. Im Vergleich mit der Konsensussequenz aus den über AUTEX assemblierten ESTs ergaben sich aus der Northernblot-Analyse bei den Genen FZD4, DAP4 und CGI-85 größere Transkripte (Tab.12). Bei den anderen Genen entsprachen die Transkriptgrößen den assemblierten Sequenzen. Mit den im Northernblot getesteten Sonden wurde die Expression der Gene auf dem cDNA-Array untersucht. Die Expressionsunterschiede wurden nach densitometrischen Auswertung für jedes Probenpaar als Verhältnis Normal- zu Tumorgewebe (N/T) dargestellt. Die in-silico differenzielle Expression der Gene ELBT und FZD4 hinsichtlich Brusttumoren konnten im cDNA-Array eindeutig bestätigt werden. Die Expression von ELBT war in acht der neun Probenpaare (Abb.13; Nr.1-8) im Tumor signifikant ($T/N < 0,25$) verringert, das Gen FZD4 zeigte sich in sieben der neun Probenpaare (Nr.1-5, 7, 8) im Tumor geringer exprimiert ($T/N < 0,5$). Die Ergebnisse des cDNA-Arrays für die Gene YAP65 und DAP4 waren heterogener. Es bestätigte sich die in-silico differenzielle Expression in vier (Nr.1, 2, 4, 8) bzw. drei Probenpaaren (1, 2, 7) mit einer beobachteten Herunterregulation in den Brusttumoren. Die Gene YAP65 und FZD4 zeigten sich auch für alle drei Ovar tumor-Probenpaare differenziell exprimiert ($T/N < 0,25$), wobei der elektronischen Northern keine entsprechende Aussage ergab. Bei den weiteren untersuchten Genen konnte die differenzielle Expression hinsichtlich Brust- oder Ovarialtumoren im cDNA-Array nicht bestätigt werden. Die Expression in den Normal- und Tumorproben war entweder kaum messbar (CGI-85 und SIP im Ovar) oder es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (MS4A6A, FAU und CLNS1A in Brust und Ovar). Das Gen ELBT zeigte die signifikantesten Expressionsunterschiede in den Proben des cDNA-Arrays und wurde als potenzielles Tumorsuppressorgen weiter untersucht.

C.3.2 Charakterisierung des potenziellen Tumorsuppressorgens ELBT

Von den neun untersuchten Genen aus der Region 11q12-q23 wurde ELBT aufgrund der bestätigten in-silico Expressionsdaten für die weitere Validierung eines potenziellen Tumorsuppressorgens ausgewählt. Es erfolgten Expressionsexperimente wie cDNA-Array-Hybridisierung und Taqmananalysen, die die verringerte Expression von ELBT in Brusttumoren belegen sollten. Mittels der Mutationsanalyse sollten mögliche Mutationen des Gens in Brusttumoren detektiert werden, die ein Ausfall des Proteins als Tumorsuppressor begründen könnten. Neben den quantitativen Expressionsstudien wurden RNA in-situ Hybridisierungen an Gewebeschnitten durchgeführt, um weitere Aussagen über die Lokalisation des Transkriptes im Brustgewebe und anderen Gewebetypen zu erhalten.

C.3.2.1 ELBT zeigte sich in Brusttumoren signifikant geringer exprimiert

ELBT wurde durch die in-silico analysierte differenzielle Expression in Brusttumoren identifiziert (Tab.14). Der elektronische Northern von ELBT zeigte ein weitgehend spezifisches Vorkommen von ESTs vor allem im Normalgewebe der Brust, Haut und Herz, sowie in geringerer Zahl in Blut-Leukozyten, Hoden und Niere.

Tab. 14: Elektronischer Northern von ELBT

Gewebetyp	Normalgewebe		Tumorgewebe		Verhältnis T/N	P-Wert α	Signifikanz in %
	Treffer	Bibliotheks-Größe	Treffer	Bibliotheks-Größe			
Blase	0	25641	1	42550	-	1	-0.0
Blut-Leukozyten	5	130844	0	941	-	1	0.0
Brust	24	120725	3	67582	0.22	0.00772	99.2
B-Zell-Lymphom	0	108530	0	7357	-	-	-
Dickdarm	0	31042	0	35626	-	-	-
Dünndarm	0	36432	0	9379	-	-	-
Endometrium	0	18977	0	6023	-	-	-
Gehirn	1	110439	0	38567	-	1	0.0
Haut	4	27182	0	1180	-	1	0.0
Herz	9	98496	0	7271	-	1	-0.0
Hoden	2	29540	0	16891	-	0.537	46.3
Leber	0	21521	0	15763	-	-	-
Lunge	1	96193	0	43114	-	1	-0.0
Magen-Speiseröhre	0	13799	2	12119	-	0.219	78.1
Myometrium	0	35843	0	14713	-	-	-
Nebenniere	0	25886	0	20230	-	-	-
Niere	2	44566	0	40078	-	0.501	49.9
Ovar	0	33687	0	41736	-	-	-
Pankreas	0	65807	0	21808	-	-	-
Prostata	0	88661	1	76762	-	0.464	53.6
Skelettmuskel	1	58315	1	27063	2.17	0.533	46.7
Squamöse Zellen	2	33833	0	25706	-	0.509	49.1
T-Zell-Lymphom	0	60680	0	17313	-	-	-

Eine signifikante differenzielle Expression ergab sich nach dem Fisher Exact Test (0,0077; 99,2%) bezüglich der Brust mit 24 ESTs im Normalgewebe gegenüber drei ESTs im Tumorgewebe. Auch die ESTs in den übrigen Geweben waren zumeist auf die Normalgewebe beschränkt. Das in-silico generierte Expressionsmuster war der erste Hinweis, dass es sich bei ELBT um ein Tumorsuppressorgen hinsichtlich der Entstehung von Brusttumoren handeln könnte.

Nach diesem ersten Hinweis der differenziellen Expression in Brusttumoren wurde zur statistisch signifikanteren Verifizierung der in-silico Ergebnisse als weiterer cDNA-basierter Blot der "Cancer Profiling Array" (CPA) mit der ELBT-Sonde hybridisiert. Der CPA repräsentiert, neben einer Vielzahl anderer Gewebe, cDNA-Proben von den Tumoren und den korrespondierenden Normalgeweben von insgesamt 50 Brusttumorpatientinnen (Abb.14). Zusammen mit drei Patientinnen, von denen neben dem Normal- und Tumorgewebe auch metastatisches Gewebe vorhanden war, wurden 53 Probenpaare zur Auswertung gebildet. Von 52 Probenpaaren konnten die Expressionsintensitäten nach Visualisierung mittels PhosphorImager über ImageQuant quantitativ ausgewertet werden. Die Berechnung der relativen Expressionsverhältnisse von ELBT zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe der Probanden erfolgte unter Berücksichtigung der Normierung der Proben nach der β -Aktin-Hybridisierung (Abb.15). Die Expressionsverhältnisse zeigten eine signifikant geringere Expression von ELBT in den Tumorproben gegenüber den Normalgeweben der Brust (Tab.15). Neben einigen selteneren Karzinom-Typen waren 33 invasiv duktile Karzinome (IDC) und neun invasiv lobuläre Karzinome (ILC) unterschiedlicher Progression (Grading) vertreten. Eine mindestens vierfach geringere Expression von ELBT gegenüber dem Normalgewebe ergab sich bei 48% der IDCs und 56% der ILCs ($T/N < 0,25$). Mindestens zehnfach geringer exprimiert waren noch 24% der IDCs und 33% der ILCs ($T/N < 0,1$). Im Gegensatz dazu wurde bei nur 8% aller Tumore eine mindestens zweifach verstärkte Expression gegenüber dem Normalgewebe festgestellt. Bei 27% aller Tumore ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede ($0,5 < T/N < 2$). Unter den dukталen Karzinomen konnten Gruppen unterschiedlichen Gratings unterschieden werden. Eine signifikante Korrelation der differenziellen Expression von ELBT zur Tumorprogression konnte bei den IDCs nicht nachgewiesen werden (Abb.16).

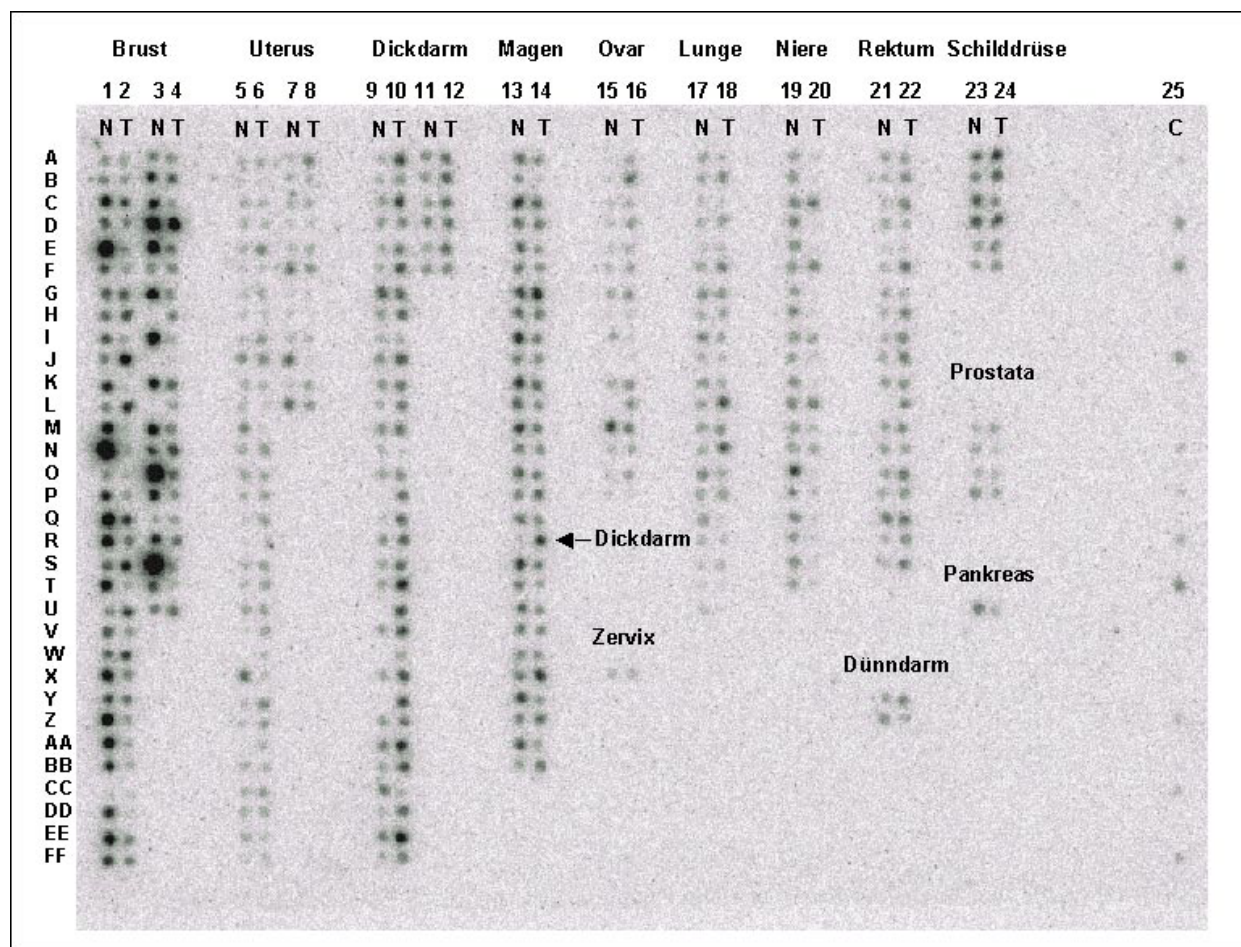


Abb.14: Expression von ELBT auf dem “Cancer Profiling Array“

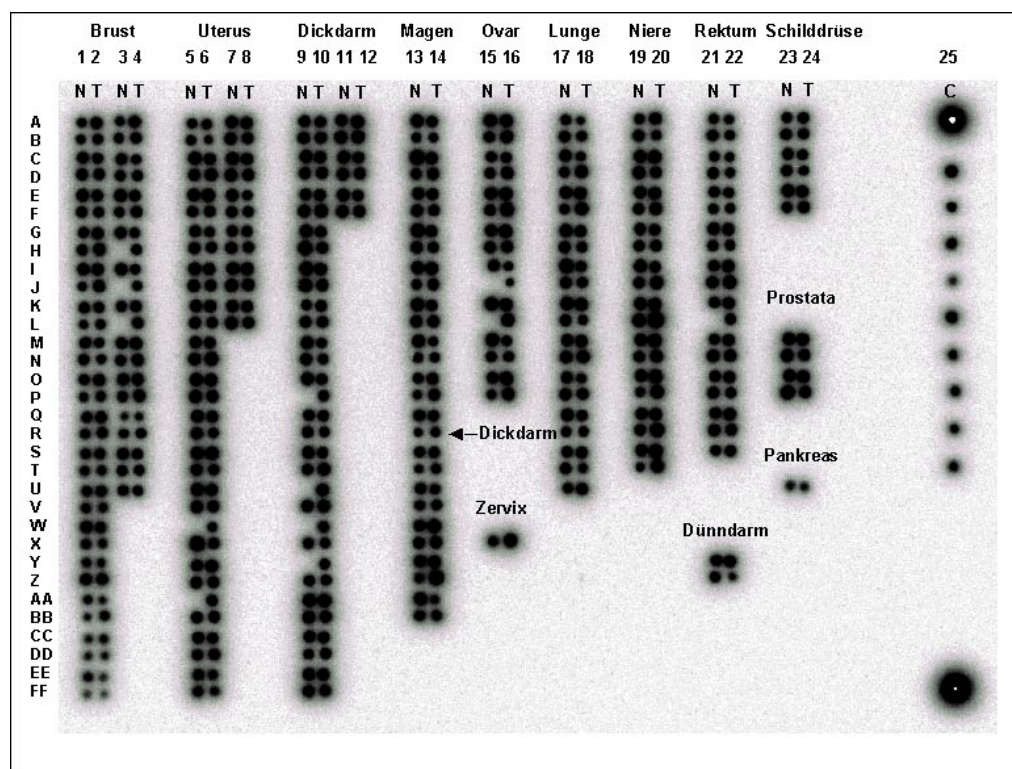


Abb.15: Expression von β -Aktin auf dem “Cancer Profiling Array“

Tab. 15: Quantitative Auswertung der Expression von ELBT in den 53 Brustgewebe-Probenpaaren des Cancer Profiling Array (CPA) über ImageQuant. Die Koordinaten X,Y geben die Lage des untersuchten Probenpaars auf dem CPA (Abb.14) wieder. Der relative Expressionslevel (T/N) bezieht sich auf die differenzielle Expression (k.A.-keine Angaben; n.a.-nicht auswertbar).

Nr.	Y	X	Histologie	Grad	Lymph-knoten	T/N	Nr.	Y	X	Histologie	Grad	Lymph-knoten	T/N
1	Q	1/2	IDC	1	k.A.	0,22	28	L	½	IDC	k.A.	negativ	3,29
2	R	1/2	IDC	1	k.A.	0,22	29	O	½	IDC	k.A.	negativ	0,46
3	S	1/2	IDC	1	k.A.	2,05	30	V	½	IDC	k.A.	k.A.	0,36
4	T	1/2	IDC	1	k.A.	0,08	31	Z	½	IDC	k.A.	k.A.	0,07
5	U	1/2	IDC	1	k.A.	3,20	32	AA	½	IDC	k.A.	k.A.	0,05
6	D	3/4	IDC	1	k.A.	0,40	33	O	¾	IDC	k.A.	positiv	0,04
7	F	3/4	IDC	1	k.A.	1,11	34	A	½	DCIS	k.A.	negativ	0,88
8	N	3/4	IDC	2B	k.A.	0,74	35	Y	½	ILC	k.A.	k.A.	0,57
9	K/L	3/4	IDC	2B	positiv	0,12	36	DD	½	ILC	k.A.	k.A.	0,02
10	A	3/4	IDC	3A	k.A.	0,63	37	EE	½	ILC	k.A.	k.A.	0,19
11	B	3/4	IDC	3A	k.A.	0,53	38	FF	½	ILC	k.A.	k.A.	0,30
12	M	3/4	IDC	3A	k.A.	0,23	39	B	½	LC	k.A.	positiv	0,65
13	G/H	3/4	IDC	3A	positiv	0,14	40	M	½	LC	k.A.	positiv	0,05
14	I/J	3/4	IDC	3A	positiv	0,01	41	F	½	LC	k.A.	negativ	0,29
15	C	1/2	IDC	k.A.	positiv	0,54	42	K	½	LC	k.A.	negativ	0,04
16	D	1/2	IDC	k.A.	positiv	0,61	43	E	¾	LC	2A	k.A.	0,15
17	E	1/2	IDC	k.A.	positiv	0,03	44	BB	½	lob-duct. Ca	k.A.	k.A.	0,07
18	H	1/2	IDC	k.A.	positiv	1,80	45	Q	¾	medulläres Ca	k.A.	negativ	1,51
19	I	1/2	IDC	k.A.	positiv	0,21	46	T	¾	muzinöses AdCa	k.A.	k.A.	0,13
20	J	1/2	IDC	k.A.	positiv	5,34	47	C	¾	tubuläres AdCa	1	k.A.	0,14
21	N	1/2	IDC	k.A.	positiv	0,01	48	W	½	tubuläres Ca	2	k.A.	1,68
22	P	1/2	IDC	k.A.	positiv	0,18	49	X	½	Fibrosarkoma	k.A.	k.A.	0,21
23	P	3/4	IDC	k.A.	positiv	0,23	50	K	¾	Metastasen	-	-	0,41
24	R	3/4	IDC	k.A.	positiv	0,39	51	G	¾	Metastasen	-	-	0,11
25	S	3/4	IDC	k.A.	positiv	0,01	52	I	¾	Metastasen	-	-	0,05
26	U	3/4	IDC	k.A.	positiv	1,30							
27	G	1/2	IDC	k.A.	negativ	1,12	53	CC	½	ILC	k.A.	k.A.	n.a.

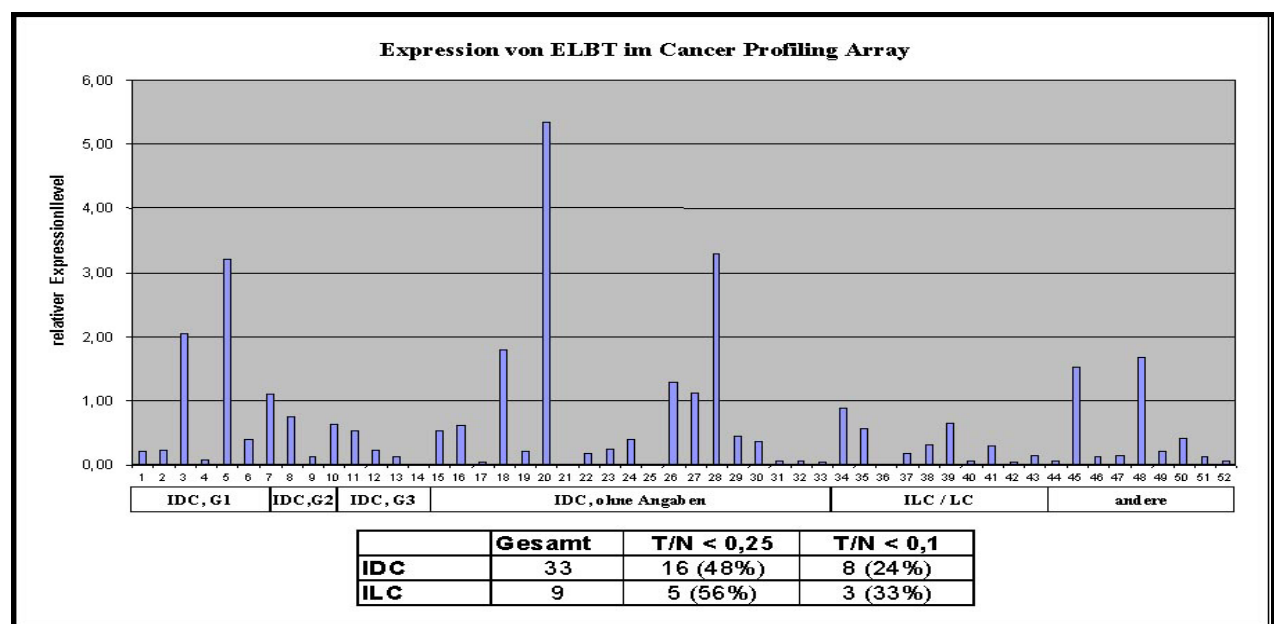


Abb.16: Darstellung der relativen Expression (T/N) von ELBT im Säulendiagramm für 52 Probenpaare mit Unterteilung der Brusttumore in histologische Typen. Die Tabelle gibt die statistische Auswertung der signifikant geringeren Expression in IDCs und ILCs wieder.

C.3.2.2 Bestätigung der ELBT-Expression in mikrodisssezierten Brustgeweben

Die differenzielle Expression von ELBT bezieht sich im elektronischen Northern und in den cDNA-Arrays auf nicht-mikrodissseziertes Gewebe. Um die differenzielle Expression hinsichtlich des Mammaepithels und daraus entstehenden Tumoren zu verifizieren, wurden quantitative Expressionsstudien an mikrodisssezierten Brusttumoren und histologisch unauffälligen Mammaepithelien durchgeführt. Nach der Mikrodisssektion erfolgte eine ELBT-spezifische Taqman-Analyse mit anschließender Bestimmung der Expressionsstärke (Tab.16). Für die Analyse wurden cDNA-Proben von 18 Brusttumoren eingesetzt, wovon 13 invasiv duktale und fünf invasiv lobuläre Karzinome waren. Von den mikrodisssezierten Normalgeweben konnten drei unterschiedliche cDNA-Proben ausgewertet werden. Alle Proben wurden zuvor über die GAPDH-Expression normiert. Nach der Auswertung der ELBT-Expression, repräsentiert durch die ermittelten CT-Werte, ergaben sich durch den Vergleich mit der Referenzprobe (Nr. B19) relative Expressionsverhältnisse (Level) zwischen den verschiedenen mikrodisssezierten Geweben. Die drei Normalepithel-Proben zeigten bis zu zweifache Expressionsunterschiede. Die mikrodisssezierten Tumore waren in überwiegender Zahl signifikant geringer exprimiert als die Normalepithelien (Abb.17). Von den dukталen Karzinomen zeigten 77% eine mindestens vierfach ($T/N < 0,25$), 46% eine mindestens zehnfach ($T/N < 0,1$) geringere Expression gegenüber der Referenzprobe. Von den lobulären Karzinomen waren alle fünf Proben (100%) mindestens vierfach, zwei Proben (40%) mindestens zehnfach herunterreguliert. Die Expressionsanalyse der mikrodisssezierten Brusttumoren und Normalepithelien bestätigte die differenzielle Expression von ELBT in einem größeren Anteil der untersuchten Probanden als in den bisherigen Expressionsexperimenten. Ein Grund dafür könnte das methodische Vorgehen der Isolierung distinkter Zellpopulationen durch die Mikrodisssektion sein, wodurch ein sensitiverer Vergleich zwischen Normal- und Tumorgewebe gewährleistet ist. Die höhergradigen dukталen Karzinome (Nr. B9-B12: IDC, G3) waren gegenüber den geringergradigen Tumoren größtenteils schwächer differenziell exprimiert, wobei diese Korrelation zur Tumorprogression bei den zahlreicheren Probenpaaren des cDNA-Arrays nicht ersichtlich war.

Tab. 16: Quantifizierung der Expression von ELBT in den mikrodisssezierten Brustgeweben nach der Taqman-PCR. Alle Proben wurden über die GAPDH-Expression normiert und der Expressionslevel aller mikrodisssezierten Proben in Bezug zur Referenzproben B19 (Mammaepithel-Probe) gesetzt.

Nr.	Histologie	Gen	CT (Mw)	Stabw	Gen	CT (Mw)	Stabw	Δ CT	Stabw Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Level	- Fehler	+ Fehler
B1	IDC, Grad 2	GAPDH	24,7	0,10	ELBT	37,1	0,19	12,4	0,22	6,9	0,008	0,00	0,0
B2	IDC, Grad 2	GAPDH	25,8	0,44	ELBT	34,2	0,29	8,4	0,53	2,9	0,136	0,04	0,1
B3	IDC, Grad 2	GAPDH	28,2	0,18	ELBT	39,9	0,2	11,7	0,27	6,2	0,014	0,00	0,0
B4	IDC, Grad 2	GAPDH	27,2	0,13	ELBT	36,1	0,14	8,9	0,19	3,4	0,096	0,01	0,0
B5	IDC, Grad 2	GAPDH	25,9	0,22	ELBT	33,5	0,00	7,6	0,22	2,1	0,238	0,03	0,0
B6	IDC, Grad 2	GAPDH	24,9	0,03	ELBT	35,8	0,31	10,9	0,31	5,4	0,024	0,00	0,0
B7	IDC, Grad 2	GAPDH	26,9	0,12	ELBT	36,8	0,33	9,9	0,35	4,3	0,049	0,01	0,0
B8	IDC, Grad 3	GAPDH	26,9	0,28	ELBT	37,5	0,13	10,6	0,31	5,1	0,029	0,01	0,0
B9	IDC, Grad 3	GAPDH	26,5	0,14	ELBT	32,8	0,48	6,3	0,50	0,8	0,594	0,17	0,2
B10	IDC, Grad 3	GAPDH	27,7	0,18	ELBT	35,5	0,28	7,9	0,34	2,3	0,200	0,04	0,1
B11	IDC, Grad 3	GAPDH	28,8	0,19	ELBT	36,4	0,45	7,5	0,49	2,0	0,251	0,07	0,1
B12	IDC, Grad 3	GAPDH	31,3	0,06	ELBT	37,7	0,66	6,5	0,66	0,9	0,524	0,19	0,3
B13	IDC, Grad 3	GAPDH	25,1	0,20	ELBT	36,3	0,34	11,2	0,39	5,7	0,020	0,00	0,0
B14	ILC, Grad 2	GAPDH	28,4	0,32	ELBT	38,7	0,03	10,3	0,32	4,8	0,036	0,01	0,0
B15	ILC, Grad 2	GAPDH	27,3	0,45	ELBT	37,1	0,08	9,8	0,46	4,3	0,052	0,01	0,0
B16	ILC, Grad 2	GAPDH	31,7	0,10	ELBT	39,3	0,87	7,6	0,88	2,1	0,231	0,10	0,2
B17	ILC, Grad 3	GAPDH	24,1	0,29	ELBT	32,9	0,31	8,8	0,43	3,3	0,103	0,03	0,0
B18	ILC, Grad 3	GAPDH	28,5	0,10	ELBT	37,1	0,04	8,6	0,11	3,1	0,116	0,01	0,0
B19	Mammaepithel	GAPDH	28,8	0,55	ELBT	34,3	1,03	5,5	1,17	0,0	1,000	0,55	1,2
B20	Mammaepithel	GAPDH	31,4	0,30	ELBT	37,9	0,32	6,5	0,44	1,0	0,505	0,13	0,2
B21	Mammaepithel	GAPDH	31,5	0,05	ELBT	36,9	0,54	5,4	0,55	-0,2	1,124	0,35	0,5

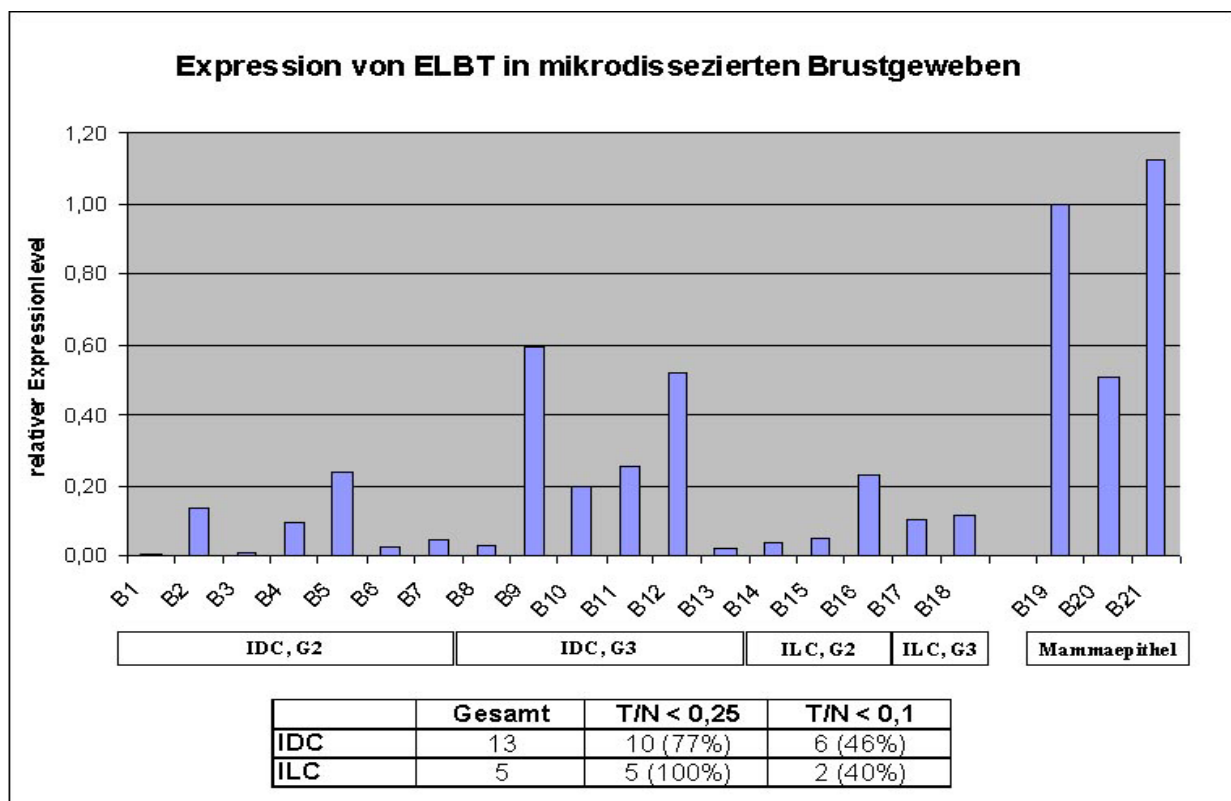


Abb.17: Darstellung der relativen Expression von 21 mikrodisssezierten Brusttumoren und Normalepithelien im Säulendiagramm mit Unterteilung der histologischen Typen. Die statistische Auswertung der signifikant geringeren Expression in Tumoren bezieht sich auf die Referenzprobe B19.

C.3.2.3 Die Mutationsanalyse des Gens ELBT ergab keine genomischen Veränderungen in Brusttumoren

Die Ergebnisse aus den Expressionsexperimenten, in denen das Gen ELBT als herunterreguliert in Brusttumoren identifiziert wurde, wiesen darauf hin, dass es sich um ein potenzielles Tumorsuppressorgen handeln könnte. Eine Möglichkeit der Validierung von Tumorsuppressorgen ist die Suche nach Mutationen in der transkribierten Sequenz. Mutationen würden zwar nicht die verringerte Expression in den Tumoren erklären, jedoch einen Hinweis auf den Verlust der Proteinfunktion von ELBT in den Tumorzellen geben und damit die These der möglichen Tumorsuppressorfunktion unterstützen. In dieser Arbeit wurden 71 Brusttumore auf Mutationen untersucht. Der erste Schritt war die Optimierung der acht Primerpaare, mit denen die acht Exons von ELBT in den Tumorproben amplifiziert wurden (Abb.18).

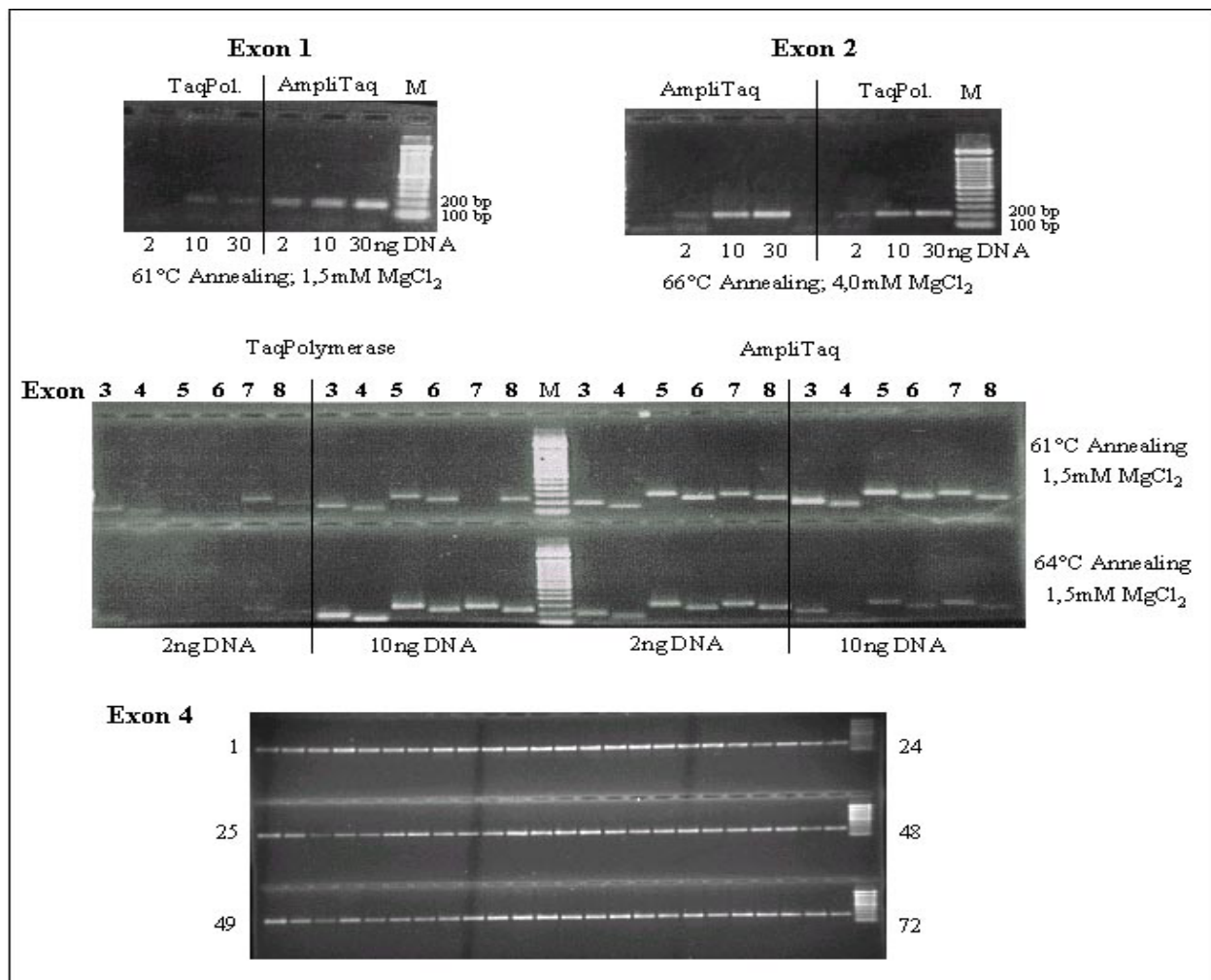


Abb.18: Optimierung der PCR für 8 Primerpaare zur Amplifikation der Exons von ELBT in den Tumor-DNA-Proben. In den oberen Bildern sind die PCR-Amplifikate für Exon 1, 2 und 3-8 bei unterschiedlichen PCR-Bedingungen gezeigt. Im unteren Bild sind exemplarisch für Exon 4 die Amplifikate der 71 Tumorproben und der Plazentakontrolle (Nr.48) gezeigt. Als Längenstandard diente ein 100bp Marker.

Die PCR-Bedingungen wurden für jedes Primerpaar mit einer Plazenta-Kontroll-DNA eingestellt. Es wurde der Einsatz der AmpliTaq Gold gegenüber der herkömmlichen TaqPolymerase für alle Primerpaare vorgezogen. Die Optimierung hinsichtlich der Annealingtemperatur und der $MgCl_2$ -Konzentration ergab für sieben von acht Primerpaaren gleiche Bedingungen (Exon 1, 3 - 8: 61°C, 1,5mM; Exon 2: 66°C, 4mM). Nach der Optimierung der PCR-Bedingungen wurden die acht Exons von ELBT in 71 Brusttumorproben und der Plazenta-DNA-Kontrolle amplifiziert. Bei wenigen Tumorproben ließen sich einzelne Exons nicht amplifizieren, was an der unzureichenden Qualität der Tumor-DNA gelegen haben könnte. Mögliche Deletionen in der Tumor-DNA wurden in diesen Fällen nicht untersucht. Von den 576 möglichen Amplifikaten aus den acht amplifizierten Exons der 72 Proben ließen sich 533 Amplifikate nach Markierung und Auftrennung im SSCP-Gel auswerten (Tab.17).

Tab. 17: Übersicht über die Bearbeitung und Ergebnisse der 72 in der Mutationsanalyse untersuchten Proben (71 Tumorproben, 1 Plazenta-Kontrolle VP). Histologische Daten zu den Tumoren lagen in einem Teil der Tumorproben vor (IDC, ILC, DCIS) oder waren nicht weiter klassifiziert (BrCa). Es konnten einige Exons in den Tumorproben nicht amplifiziert werden (negativ), die meisten Amplifikate waren im SSCP-Gel unauffällig (-) oder wurden aufgrund auffälliger SSCP-Analysen anschließend sequenziert (Seq).

Nr.	Tumor	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8	Nr.	Tumor	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8
1	BrCa	negativ	-	-	-	-	-	-	-	37	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-
2	BrCa	Seq	-	-	-	-	-	Seq	-	38	BrCa	-	-	-	Seq	-	-	-	-
3	BrCa	-	-	-	Seq	-	-	-	-	39	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-
4	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	Seq	40	BrCa	-	Seq	-	-	negativ	-	-	-
5	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	41	BrCa	-	Seq	-	-	Seq	-	-	-
6	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	42	BrCa	-	Seq	-	-	Seq	-	-	-
7	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	Seq	43	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-
8	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	Seq	44	BrCa	-	-	Seq	-	-	Seq	-	-
9	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	45	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-
10	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	46	BrCa	-	-	-	-	-	Seq	-	-
11	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	47	BrCa	negativ	-	-	-	-	-	negativ	-
12	BrCa	-	-	-	-	-	-	Seq	-	48	Plazenta	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP
13	BrCa	-	-	Seq	-	-	-	-	-	49	ILC	-	-	-	-	-	-	-	-
14	BrCa	-	-	-	-	Seq	-	-	-	50	ILC	negativ	-	-	-	negativ	-	-	-
15	BrCa	-	-	-	-	Seq	-	-	Seq	51	IDC	negativ	-	-	-	negativ	-	negativ	-
16	BrCa	-	-	Seq	-	-	-	-	Seq	52	IDC	-	-	-	-	negativ	-	-	-
17	BrCa	-	-	-	-	-	-	Seq	-	53	IDC	negativ	-	-	-	negativ	-	negativ	-
18	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	54	IDC	negativ	-	-	-	negativ	-	-	-
19	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	Seq	55	IDC	negativ	-	Seq	-	negativ	-	-	-
20	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	56	IDC	-	-	-	-	negativ	-	-	-
21	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	57	IDC	-	Seq	-	-	-	-	-	-
22	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	Seq	58	IDC	-	-	-	-	Seq	-	-	-
23	BrCa	-	-	-	-	Seq	-	-	Seq	59	IDC	-	Seq	-	-	Seq	-	-	-
24	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	60	IDC	negativ	-	-	-	-	negativ	-	-
25	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	61	ILC	negativ	-	-	-	-	negativ	-	-
26	BrCa	-	-	-	Seq	-	Seq	-	Seq	62	BrCa	negativ	-	Seq	-	negativ	negativ	-	-
27	BrCa	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	negativ	-	63	BrCa	negativ	-	-	-	-	-	-	Seq
28	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	64	BrCa	-	-	-	-	negativ	negativ	-	Seq
29	BrCa	negativ	negativ	-	-	negativ	-	-	-	65	BrCa	negativ	-	-	-	-	-	-	-
30	BrCa	negativ	negativ	-	Seq	Seq	-	Seq	-	66	IDC	-	-	-	-	-	-	-	Seq
31	BrCa	-	-	-	-	-	Seq	-	Seq	67	DCIS	-	-	-	-	-	-	-	Seq
32	BrCa	-	-	-	Seq	Seq	Seq	-	-	68	BrCa	-	Seq	-	Seq	-	-	-	-
33	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	69	BrCa	negativ	-	-	-	-	-	-	-
34	BrCa	-	-	-	-	-	-	-	-	70	IDC	negativ	Seq	-	Seq	-	Seq	-	Seq
35	BrCa	-	-	-	Seq	-	-	-	-	71	DCIS	-	Seq	-	Seq	-	Seq	-	Seq
36	BrCa	-	-	-	-	-	Seq	-	-	72	IDC	-	-	-	-	negativ	-	-	-

Die 43 negativen Proben konnten auch nach wiederholter PCR nicht amplifiziert werden oder waren nach der SSCP-Analyse nicht auswertbar. Insgesamt waren die amplifizierten Exons von 473 Tumorproben im SSCP-Gel unauffällig und wurden nicht weiter untersucht. 60 PCR-Fragmente zeigten in der SSCP-Analyse im Vergleich zur Kontroll-DNA auffällige Bandenshifts, die auf eine Mutation hindeuten könnten. Die anschließende Sequenzierung dieser 60 Amplifikate erbrachte in keinem einzigen Fall einen Hinweis auf mögliche Mutationen oder Polymorphismen im ELBT-Transkript.

C.3.2.4 Expression von ELBT in Leber, Brust, Hoden und Blutleukozyten

Der elektronische Northern gab die größte EST-Frequenz des Gens ELBT in den Bibliotheken für Brust-Normalgewebe wieder. Darüber hinaus zeigten die in-silico Daten die Expression von ELBT in den Geweben Haut, Herz, Hoden und Blutleukozyten an (C.3.2.1, Tab.14). Dieses Expressionsmuster wurde durch die Northernblot- und Taqman-Analyse verifiziert und erweitert. Der MTN-Northernblot mit 16 verschiedenen Geweben ergab nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten ELBT-Sonde (Klon H25327) eine spezifische Bande mit der erwarteten Fragmentgröße von etwa 2,4kb (C.3.1, Abb.13). Die stärkste Expression von ELBT zeigte sich in Leber, eine moderate Expression in Blutleukozyten und Hoden sowie eine sehr schwache Expression in Herz und anderen Geweben. Die Expression von Herz im elektronischen Northern konnte im Northernblot nicht bestätigt werden, während die starke Expression von Leber im Northernblot nicht im elektronischen Northern auftrat. Die moderate Expression von ELBT im Hoden und in den Blutleukozyten korrelierten in beiden Expressions-experimenten.

Um die Expression von ELBT in einem größeren Gewebespektrum zu untersuchen, wurden Taqman-Analysen mit cDNA-Proben von 22 verschiedenen Geweben, sechs Brusttumor-Zelllinien und drei Ovar tumor-Zelllinien durchgeführt (Tab.18). Die quantitative Auswertung der Taqman-PCR erfolgte nach Normierung der cDNA-Proben über die GAPDH-Expression. Die Expressionslevel von ELBT in den Geweben und Zelllinien bezogen sich auf das Brustgewebe als Referenzwert. Das Ergebnis korrelierte sehr gut mit den Expressionsdaten des Northernblots. Die stärkste Expression von ELBT wurde in Leber nachgewiesen, gefolgt von den Geweben Brust und Hoden (Abb.19). Die übrigen Gewebe zeigten in Bezug auf Brustgewebe eine sehr schwache Expression, in den Tumorzelllinien war ELBT nicht mehr nachweisbar. Eine Normierung

der cDNA-Proben auf β -Aktin analog zum Northernblot ergab vergleichbare Expressionslevel.

Tab. 18: Auswertung der Taqman-PCR von 22 Geweben und 9 Tumorzelllinien. Die CT-Werte ergaben sich aus dem Mittelwert (Mw) des dreifachen PCR-Ansatzes mit Angaben der Standardabweichung (Stabw). Alle Proben wurden über die GAPDH-Expression normiert (Δ CT). Die relativen Expressionsverhältnisse (Level) der Proben beziehen sich auf Brust als Referenzprobe (Level=1).

Name	Gen	CT (Mw)	Stabw	Gen	CT (Mw)	Stabw	Δ CT	Stabw Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Level	- Fehler	+ Fehler
Gehirn	GAPDH	21,1	0,23	ELBT	27,8	0,18	6,7	0,29	6,4	0,01	0,00	0,00
Speicheldrüse	GAPDH	21,8	0,14	ELBT	27,8	0,16	6,1	0,21	5,8	0,02	0,00	0,00
Schilddrüse	GAPDH	21,6	0,01	ELBT	27,1	0,08	5,6	0,09	5,3	0,03	0,00	0,00
Magen	GAPDH	23,8	0,3	ELBT	28,8	0,24	5,0	0,38	4,7	0,04	0,01	0,01
Thymus	GAPDH	21,2	0,02	ELBT	27,1	0,19	5,9	0,19	5,6	0,02	0,00	0,00
Uterus	GAPDH	22,0	0,24	ELBT	31,2	0,13	9,2	0,27	8,9	0,00	0,00	0,00
Prostata	GAPDH	22,3	0,19	ELBT	29,0	0,3	6,7	0,36	6,4	0,01	0,00	0,00
Skelettmuskel	GAPDH	19,3	0,25	ELBT	30,4	0,09	11,1	0,27	10,8	0,00	0,00	0,00
Dünndarm	GAPDH	22,6	0,21	ELBT	28,9	0,15	6,3	0,26	6,1	0,01	0,00	0,00
Herz	GAPDH	21,5	0,49	ELBT	27,4	0,21	5,9	0,53	5,6	0,02	0,01	0,01
Plazenta	GAPDH	23,2	0,04	ELBT	30,7	0,21	7,4	0,21	7,1	0,01	0,00	0,00
Hoden	GAPDH	23,2	0,17	ELBT	24,9	0,05	1,6	0,18	1,3	0,40	0,05	0,05
Milz	GAPDH	23,4	0,1	ELBT	28,5	0,24	5,2	0,26	4,9	0,03	0,01	0,01
Hypophyse	GAPDH	22,9	0,24	ELBT	30,9	0,28	8,1	0,37	7,8	0,00	0,00	0,00
Pankreas	GAPDH	25,8	0,19	ELBT	31,0	0,27	5,2	0,33	5,0	0,03	0,01	0,01
Leber	GAPDH	23,7	0,24	ELBT	22,4	0,28	-1,2	0,37	-1,5	2,89	0,65	0,84
Brust	GAPDH	22,5	0,14	ELBT	22,8	0,15	0,3	0,21	0,0	1,00	0,13	0,15
Lunge	GAPDH	23,2	0,15	ELBT	28,2	0,1	5,0	0,18	4,8	0,04	0,00	0,00
Lymphknoten	GAPDH	24,2	0,3	ELBT	28,9	0,33	4,8	0,45	4,5	0,04	0,01	0,02
Dickdarm	GAPDH	23,3	0,11	ELBT	29,4	0,15	6,1	0,19	5,9	0,02	0,00	0,00
Niere	GAPDH	23,2	0,05	ELBT	29,9	0,26	6,7	0,26	6,4	0,01	0,00	0,00
Cervix	GAPDH	26,5	0,15	ELBT	32,1	0,25	5,6	0,30	5,3	0,03	0,00	0,01
MCF7	GAPDH	21,2	0,02	ELBT	28,7	0,19	7,6	0,19	7,3	0,01	0,00	0,00
T47D	GAPDH	23,1	0,07	ELBT	30,9	0,19	7,8	0,20	7,5	0,01	0,00	0,00
MDA231	GAPDH	21,2	0,11	ELBT	29,6	0,14	8,4	0,18	8,1	0,00	0,00	0,00
BT474	GAPDH	21,4	0,1	ELBT	31,4	0,28	10,0	0,30	9,7	0,00	0,00	0,00
MDA453	GAPDH	20,7	0,12	ELBT	29,2	0,43	8,5	0,45	8,2	0,00	0,00	0,00
SKBR3	GAPDH	20,6	0,26	ELBT	30,2	0,12	9,6	0,29	9,3	0,00	0,00	0,00
EB-2	GAPDH	19,7	0,16	ELBT	29,0	0,32	9,2	0,36	9,0	0,00	0,00	0,00
PA-1	GAPDH	21,3	0,07	ELBT	33,2	0,18	11,9	0,19	11,6	0,00	0,00	0,00
BG-1	GAPDH	21,0	0,16	ELBT	30,0	0,08	9,0	0,18	8,7	0,00	0,00	0,00

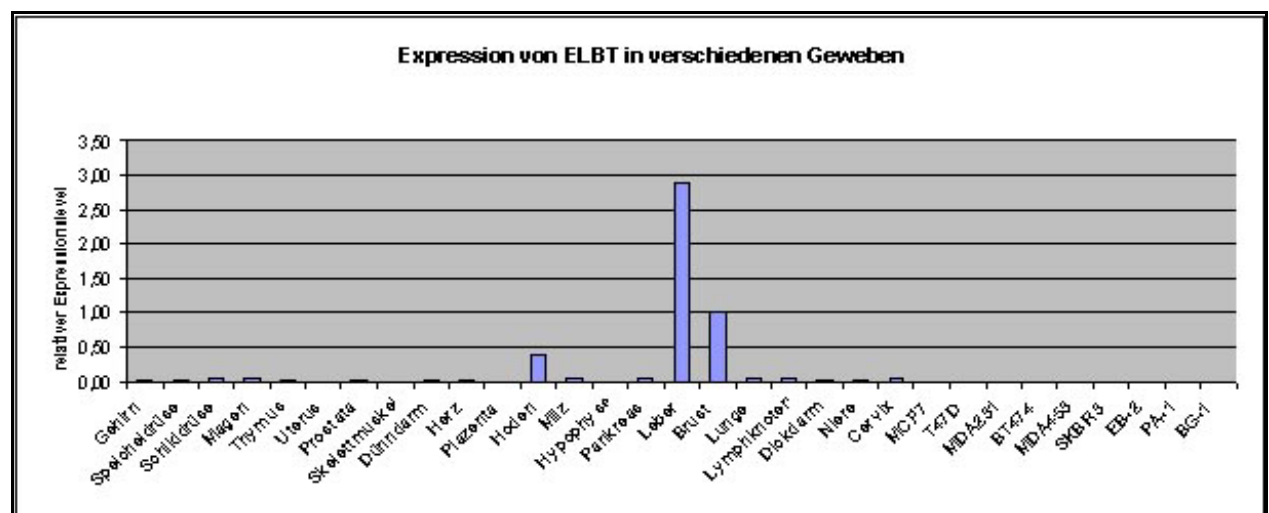


Abb.19: Darstellung der Expression von ELBT in verschiedenen Geweben im Säulendiagramm. Der relative Expressionslevel bezieht sich auf den Δ CT-Wert der Brust-Probe. Es zeigt sich eine spezifische Expression in Leber, Brust und Hoden.

C.3.2.5 Die RNA in-situ Hybridisierung zeigte die Expression von ELBT in Brustepithelzellen und in der Haut

Die quantitativen Expressionsexperimente ergaben Aufschluss über die differenzielle Expression von ELBT zwischen dem normalem Epithel und den daraus entstehenden Tumoren des Brustgewebes. Mittels der RNA in-situ Hybridisierung wurde die Expression von ELBT in Gewebeschnitten visualisiert. Durch diese qualitative Expressionsstudie sollte die Transkriptionsaktivität des ELBT-Gens distinkten Zellpopulationen zugeordnet werden und die Expressionsverhältnisse der bisherigen Experimente bestätigen. Der Nachweis der ELBT-Expression erfolgte auf Paraffinschnitten von Normalgeweben und Tumoren der Brust, desweiteren auf Gewebe-Arrays mit Paraffinschnitten von unterschiedlichen Organen und Tumoren. Die ELBT-spezifischen Sonden wurden durch Linearisierung des Klon H25327 und in-vitro Transkription von 1µg linearisierter DNA präpariert (Abb.20).

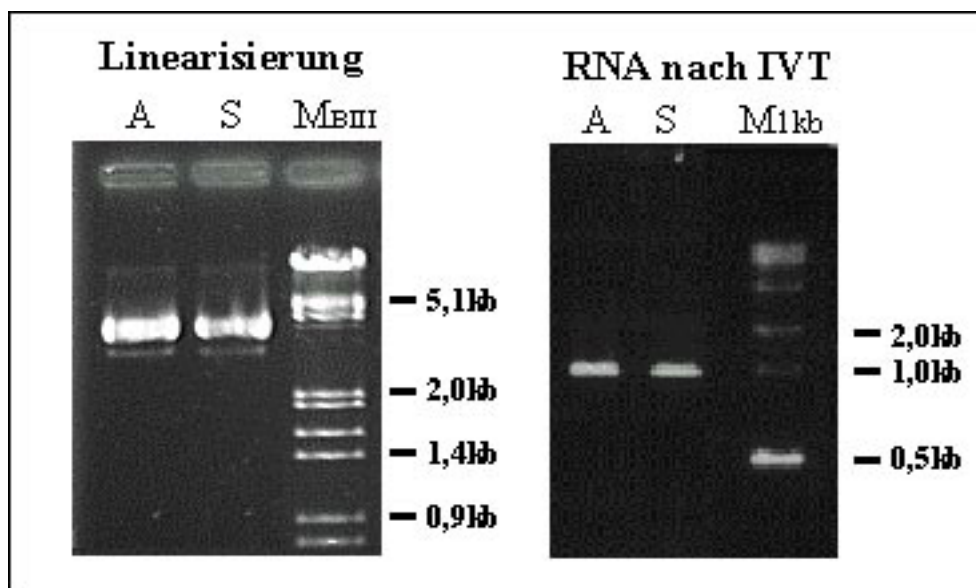


Abb.20: Fragmente der Antisense (A)- und Sense (S)-Sondenpräparation von ELBT (Klon H25327) nach der Linearisierung und der in-vitro Transkription (IVT).

Die DIG-markierten Antisense- und Sense-RNA-Sonden waren etwa 1kb lang und wurden für die Hybridisierung der Gewebeschnitte in einer Konzentration von 2,5ng/µl eingesetzt. Die Visualisierung der an die zelluläre RNA gebundenen Sonde erfolgte nach der Inkubation mit dem Farbstoff BM-Purple durch ein blau-violettes Präzipitat. Präparate, die mit der Antisense-RNA-Sonde von ELBT hybridisiert wurden, zeigten im Falle der Expression des Gens nach drei bis vier Tagen Färbung bei 4°C einen Farbniederschlag. Die Gewebeschnitte, die zur Kontrolle mit der Sense-RNA-Sonde von ELBT hybridisiert wurden, waren negativ. Die rosa Gegenfärbung des gesamten

Gewebes war Resultat der nachfolgenden Kernechtrot-Inkubation der Schnitte. Aufgrund der besseren histologischen Beurteilung der Gewebe wurden neben den Versuchspräparaten die entsprechenden Hämalaun-Eosin-gefärbten Schnitte dargestellt. Die Hybridisierung von Brustgewebe mit normalen Epithelien und Tumoren verschiedener Probanden zeigte ausschließlich eine schwache Expression von ELBT in normalen Epithelzellen der Drüsengänge (Abb.21). Die detektierten Signale waren in den Drüsenstrukturen nicht gleichmäßig verteilt, sondern erschienen stärker in den lobulären Endverzweigungen der Drüsengänge (Lobuli). Das Bindegewebe und die Fettzellen im umliegenden Brustgewebe waren negativ. In keinem Fall der untersuchten Brusttumore (10 IDCs und 6 ILCs) konnte eine Expression von ELBT festgestellt werden (Abb.22). Im Gegensatz dazu wurde eine schwache ELBT-Aktivität bei der Untersuchung weiterer Tumore in Leberkarzinomzellen nachgewiesen. Tumore des Verdauungstraktes, der Reproduktionsorgane und des Urogenitaltraktes waren alle negativ. Auffallend spezifisch und stark war die Expression von ELBT in distinkten Hautschichten, erstmals detektiert in Hautanteilen der Brustgewebe. Diese Expression an der Grenzschicht von *Stratum granulosum* und *Stratum lucidum* zum *Stratum corneum* konnte in weiteren Hautpräparaten bestätigt werden (Abb.23). Bei der 400fachen Vergrößerung lassen sich ein bis zwei positive Zellreihen unterhalb der verhornten Hautschicht erkennen, die schon weiter ausdifferenziert erscheinen. Eine weitere starke Expression von ELBT konnte in den Schweißdrüsen der Haut detektiert werden (Abb.24). Dabei schien die Expressionsintensität von ELBT innerhalb der Schweißdrüse von den äußeren sekretorischen Zellen zu den dem Lumen zugewandten Zellen abzunehmen (Abb.24, rechte Spalte). Die starke Expression in der Haut deutete sich in den bisherigen Experimenten nur durch die EST-Zahlen des elektronischen Northern an. Im Vergleich zu den quantitativen Expressionsexperimenten spiegelten die Ergebnisse der RNA in-situ Hybridisierung von ELBT in den Gewebeschnitten die differenzielle Expression in Brusttumoren und die schwache Expression in weiteren Geweben wieder.

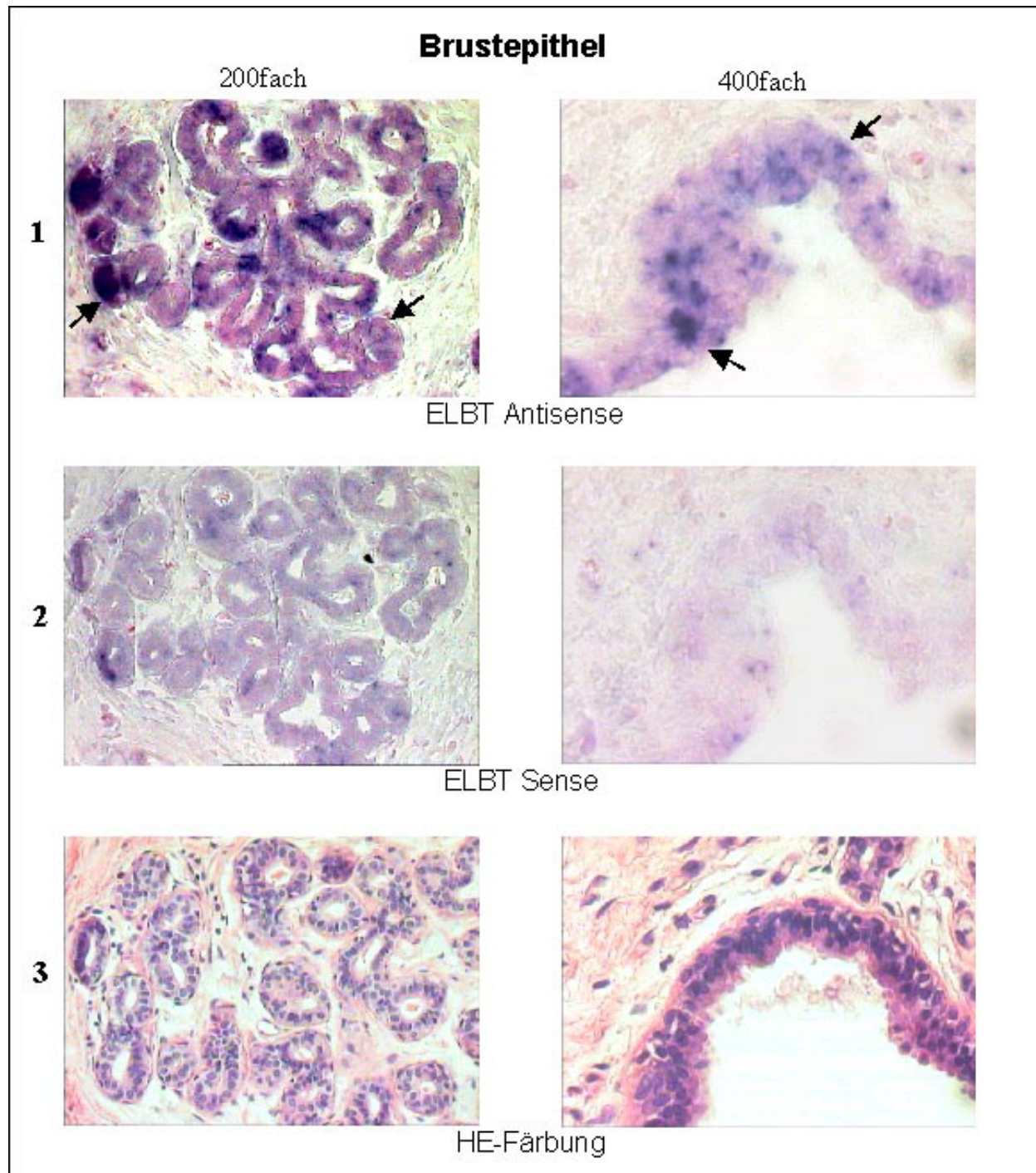


Abb.21: Expression von ELBT im Drüsenepithel der Brust. Die beiden Ausschnitte in der oberen Reihe zeigen die Expressionssignale nach der Antisense-Sonden-Hybridisierung visualisiert durch den blauen Niederschlag von BM Purple. Die mittleren äquivalenten Ausschnitte aus dem Präparat, hybridisiert mit der Sense-Sonde, stellen die Negativkontrolle des Experimentes dar. In der unteren Reihe sind die Gewebeareale zur histologischen Beurteilung nach Hämalaun-Eosin-Färbung dargestellt. In der linken Spalte ist ein Lobulus in der 200fachen mikroskopischen Vergrößerung gezeigt, in der rechten Spalte ein Ausschnitt der Epithelzellen (Pfeile) in 400facher Vergrößerung.

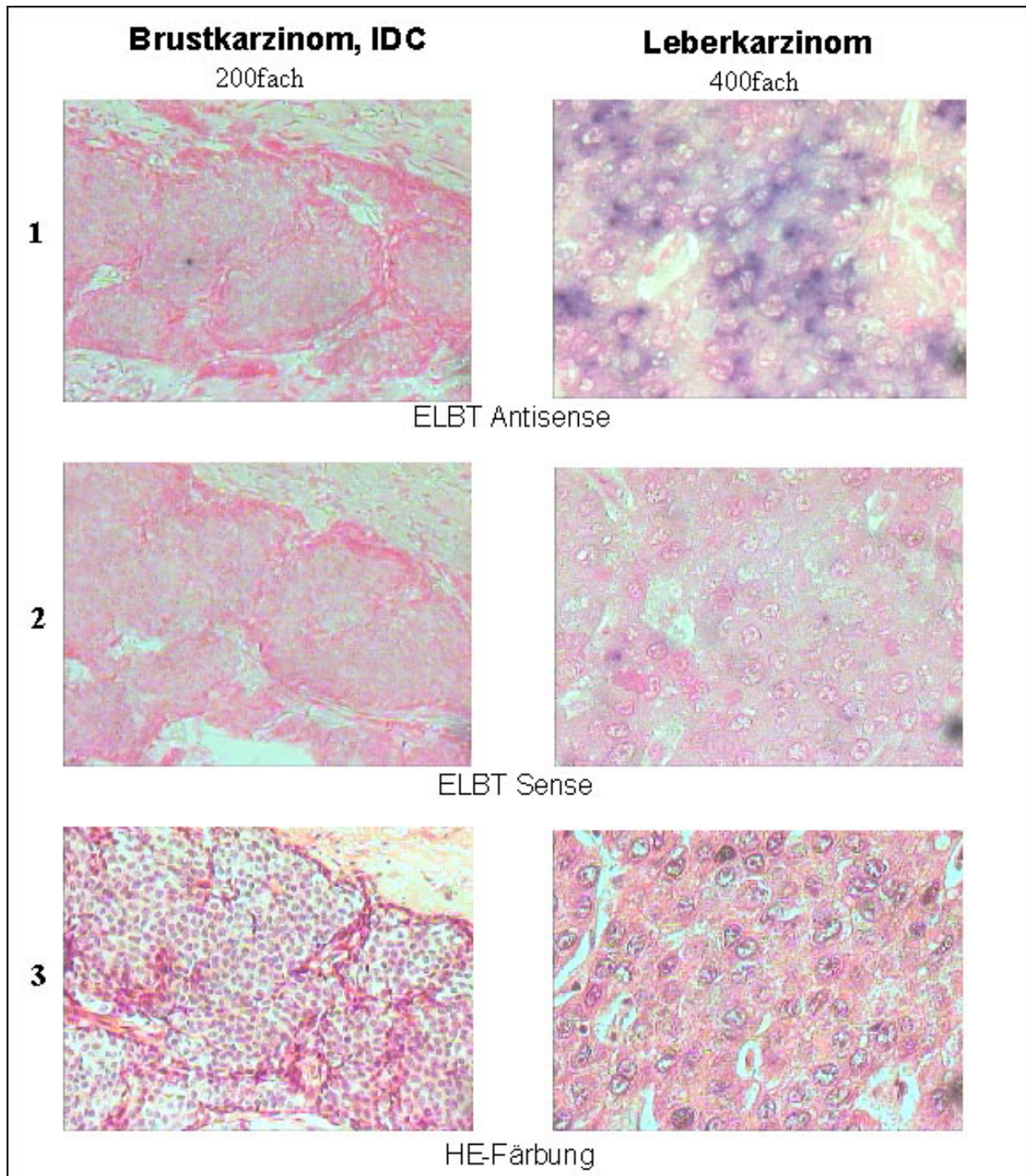


Abb.22: Expression von ELBT in verschiedenen Tumoren. Im Brusttumor (IDC) konnte keine Expression von IDC nachgewiesen werden (linke Bildreihe). Eine schwache Expression konnte in Zellen des Leberkarzinoms detektiert werden (rechte Bildreihe).

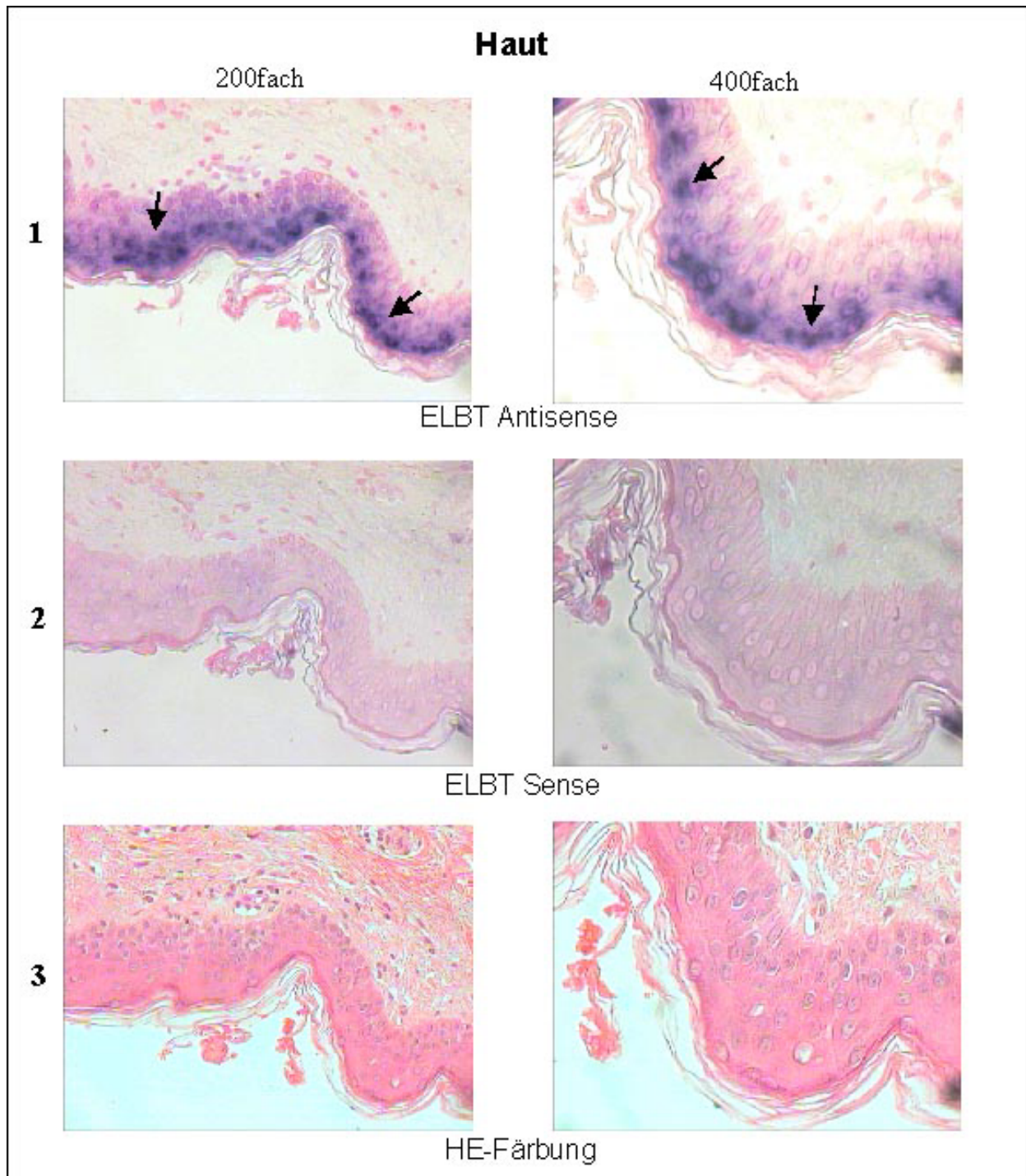


Abb.23: Expression von ELBT in Hautanteilen des Brustgewebe-Präparates. Es zeigt sich in der oberen Reihe ein sehr spezifisches Signal in den Hautschichten *Stratum granulosum* und *Stratum lucidum* an der Grenze zur *Stratum corneum* (Pfeile).

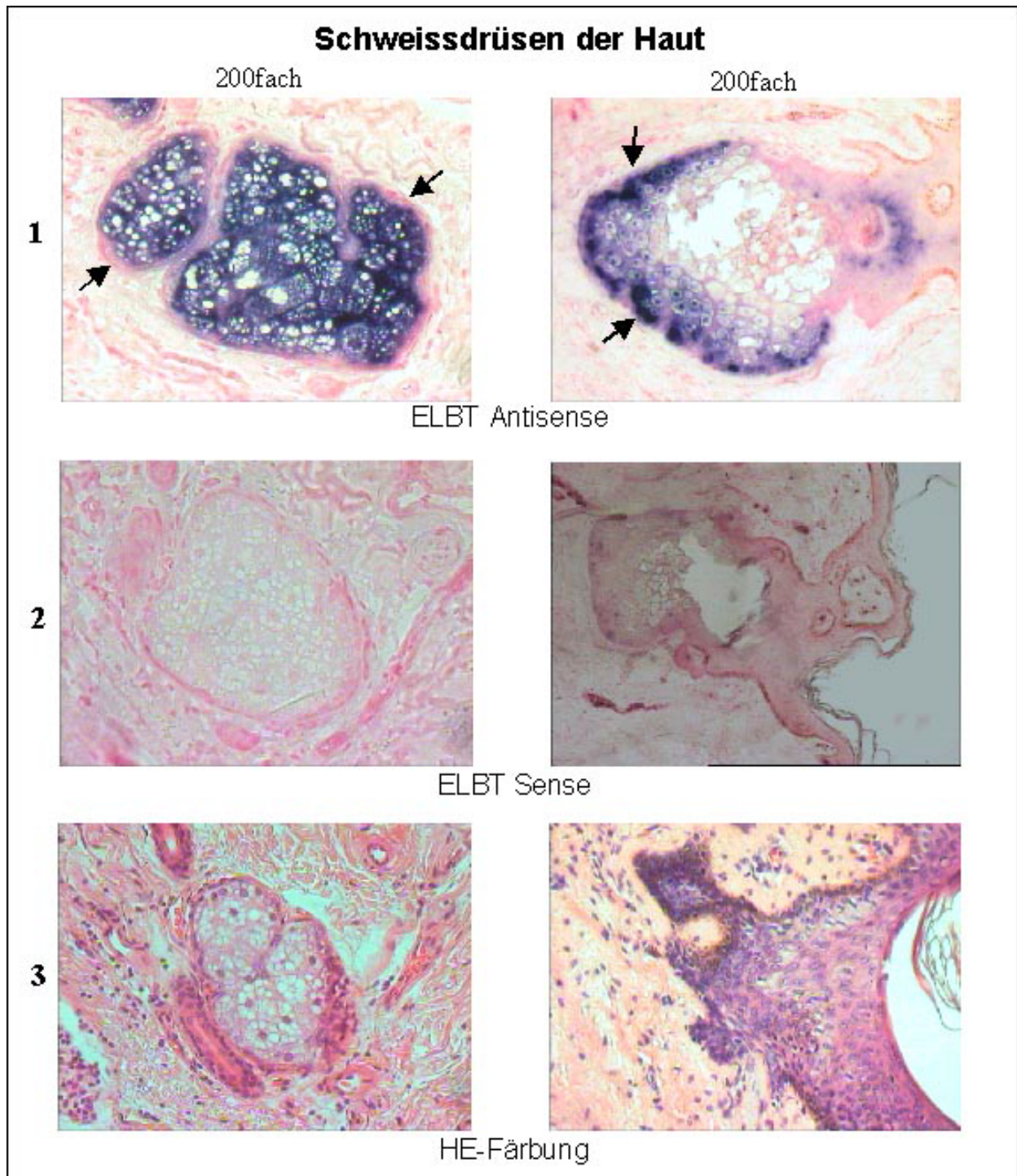


Abb.24: Expression von ELBT in den sekretorischen Zellen von Schweißdrüsen (Pfeile) in der Haut. In der linken Bilderspalte ist die Schweißdrüse tiefer im Gewebe angeschnitten, in der rechten Bilderspalte ist die positive Schweißdrüse direkt unter der Epidermis lokalisiert.

C.3.2.6 Transkriptanalyse und genomische Struktur von ELBT

Das durch den in-silico Ansatz identifizierte Gen ELBT ergab nach der Assemblierung der ESTs durch AUTEX eine cDNA-Länge von 2408 Basenpaaren. Die Transkriptlänge konnte in den Northernblot-Experimenten bestätigt werden, Spleissvarianten wurden nicht identifiziert. Der größte offene Leserahmen betrug 1164bp und ergab ein mögliches translatiertes Protein von 388 Aminosäuren. Zur Verifizierung der Sequenz wurden verschiedene Klone aus dem Assembly sequenziert, die zudem als Sonde für die Expressionsexperimente dienten. Das 5'-Ende des Gens zeigte innerhalb der assemblierten ESTs Sequenzvariationen, die nicht von öffentlichen Klonen abgedeckt waren. Daher wurde eine RACE-PCR mit einem ELBT-spezifischen 3'-Primer durchgeführt, das amplifizierte PCR-Fragment von ca. 550bp kloniert und sequenziert (Abb.25). Mit der gesicherten Sequenzinformation wurde nahezu das gesamte Transkript (P1: 1,4kb; P2: 2,3kb) einschließlich des kodierenden Bereiches amplifiziert, kloniert und sequenziert.

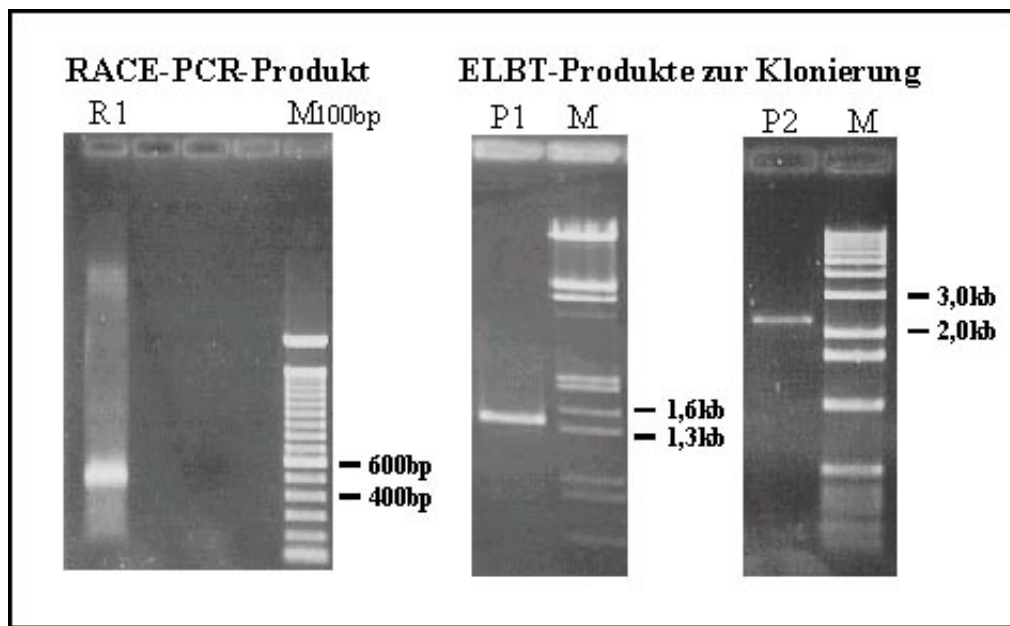


Abb.25: Ergebnis der RACE-PCR zur Verifizierung des 5'-Endes (R1) und der Amplifikation von ELBT-Fragmenten (P1, P2) zur Klonierung der kodierenden Sequenz.

Um die genomische Struktur des Gens zu ermitteln, wurde die cDNA-Sequenz gegen die humane genomische Sequenzdatenbank abgeglichen. Dabei wurden zwei sich überlappende BAC-Sequenzen (AP000649; AC021221) identifiziert, die zusammen assembliert die gesamte genomische Sequenz von ELBT abdecken (Abb.26). Die BACs kartierten gemäß der annotierten Sequenzdatenbank in die chromosomale

Region 11q13.5 und bestätigten die Lokalisation von ELBT. Nach einem Vergleich der cDNA- und genomischen Sequenz ergaben sich für ELBT insgesamt 8 Exons über eine Gesamtlänge des Gens von etwa 30kb. Die Exon-Intron-Übergänge konnten anhand der charakteristischen Signalsequenzen (GT...AG) identifiziert werden. Auf der Sequenz der beiden assemblierten BACs waren mit der cDNA FLJ22644 und dem bekannten Gen UVRAG zwei weitere Transkripte lokalisiert, die ELBT flankieren. UVRAG wurde in Komplementationsexperimenten für UV-Sensitivität als Kandidatengen für Xeroderma pigmentosum beschrieben (Perelman et al., 1997).

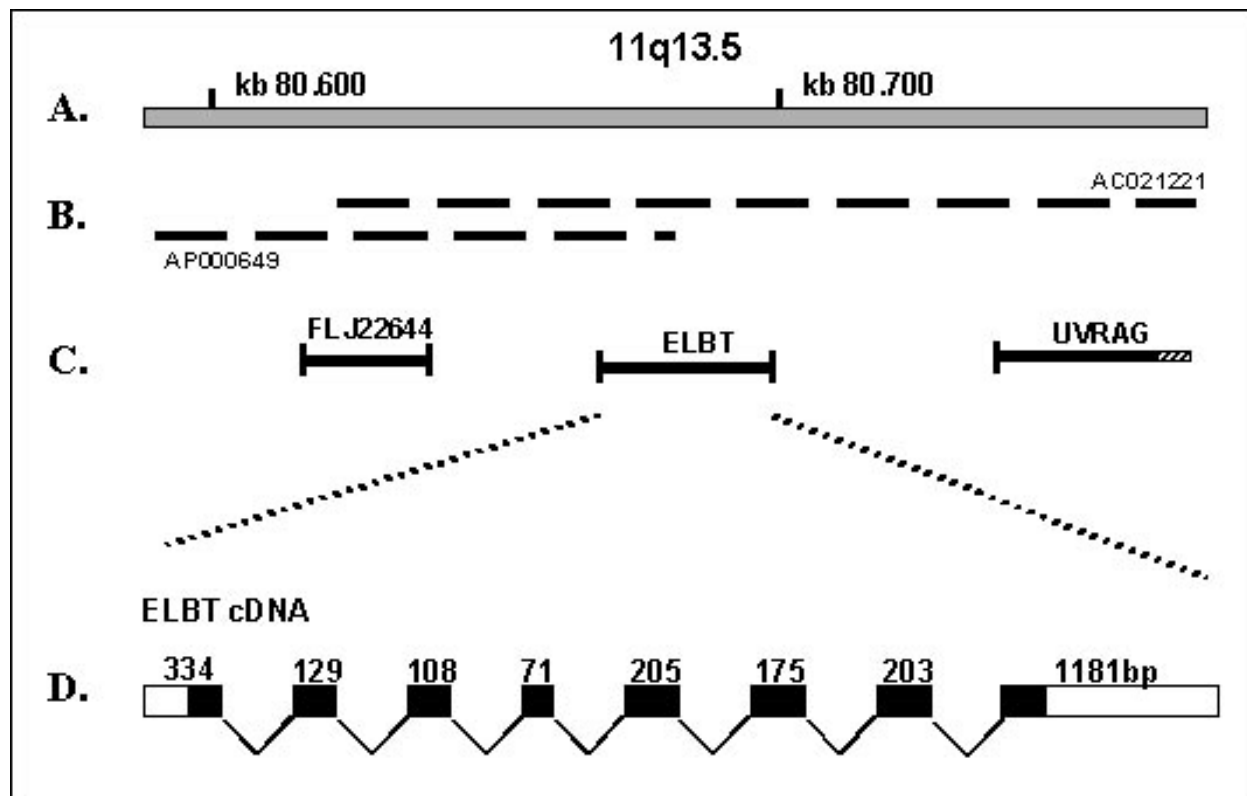


Abb.26: Chromosomale Lokalisation und genomische Struktur von ELBT. Oben ist die physikalische Lokalisation des Gens in 11q13.5 angegeben (A.). Das Gen ELBT wird von den BACs AP000649 und AC021221 der genomischen Sequenzdatenbank UCSC abgedeckt (B.). Innerhalb der Region liegt ELBT zwischen den Genen FLJ22644 und UVRAG (C.). Das Gen besteht aus 8 Exons (Kästen) mit einer Transkriptlänge von insgesamt 2408bp und umspannt etwa 30kb (D.).

Der aktuellste Datenbankabgleich (Oktober 2001) ergab Sequenzübereinstimmungen zum Unigene-Cluster Hs.334305 mit den Einträgen "GS1999full" (gi14211870) und "Diacylglycerol acyltransferase 2" (DGAT2, gi15099952). DGAT2 codiert ein Protein von 387aa und ist mit einer geringen Abweichung von 4bp des offenen Leserahmens identisch zu ELBT (translatierte Sequenz siehe Anhang G.4).

C.3.2.7 Das Protein ELBT ist eine putative Acyltransferase

Die Zusammenstellung einer potenziellen ELBT-Proteinfamilie beruhte auf den Protein-Datenbank-Vergleich (nr, NCBI) des humanen ELBT mit 388 Aminosäuren (Stand 1. Juli 2001). Es konnten insgesamt 18 putative Proteine der ELBT-Familie mit einem vorgegebenen Erwartungswert ($E > 4e^{-5}$) zugeordnet werden (Abb. 27.1/2). Die Ähnlichkeit zwischen der humanen und der Maus-Sequenz (gi12832432) betrug auf der Proteinebene 95%. Die weiteren putativen Proteine unbekannter Funktion wurden bei unterschiedlichen Organismen gefunden, wie beispielsweise *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Mycobacterium tuberculosis*, was auf eine hohe Konservierung dieser Proteinfamilie hindeutete. Innerhalb der Proteinsequenz bilden die Aminosäuren 73-95 eine Transmembran-Domäne (TMHMM, Version 2.0).

Der erste Hinweis auf eine Acyltransferase-Funktion von ELBT erbrachte nach der Datenbanksuche ($E = 4e^{-4}$) die Identifizierung eines hypothetischen Proteins *Mycobacterium tuberculosis* (gi7476966). Dieses Protein wurde als Acyltransferase im Pfam64 Modell identifiziert ($E = 2,1e^{-27}$). Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde mit der ELBT-Proteinsequenz eine iterative PSIBLAST-Suche gegen die Proteindatenbank (nr) durchgeführt und alle Proteine über dem vorgegebenen Erwartungswert ($E > 1e^{-5}$) eingesammelt. Nach vier PSIBLAST-Runden wurden neben den Mitgliedern der potenziellen ELBT-Proteinfamilie eine gut annotierte 1-Acyl-SN-Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (1-AGPAT) von *Borrelia burgdorferi* (gi3914378) mit signifikantem Erwartungswert ($E = 1e^{-4}$) identifiziert. Die reziproke PSIBLAST-Suche mit 1-AGPAT führte neben der Identifizierung von 230 putativen 1-AGPAT-ähnlichen Acyltransferasen wiederum zum oben genannten Protein (gi7476966) von *M. tuberculosis*, das als mögliche Verbindung zur ELBT-Familie gesehen wurde. Um dies zu bestätigen, wurde ein erneuter PSIBLAST ($E > 4e^{-5}$) mit diesem Protein als Matrize durchgeführt. Neben einigen Mitgliedern der ELBT-Familie (beispielsweise gi7304166 von *Drosophila melanogaster* und gi6324819 von *Saccharomyces cerevisiae*) wurden auch Mitglieder der 1-AGPAT-Proteinfamilie (beispielsweise gi7477100 von *Mycobacterium tuberculosis*, gi7479681 von *Streptomyces coelicolor*) identifiziert und damit eine Verbindung zwischen den beiden Proteinfamilien gezeigt.

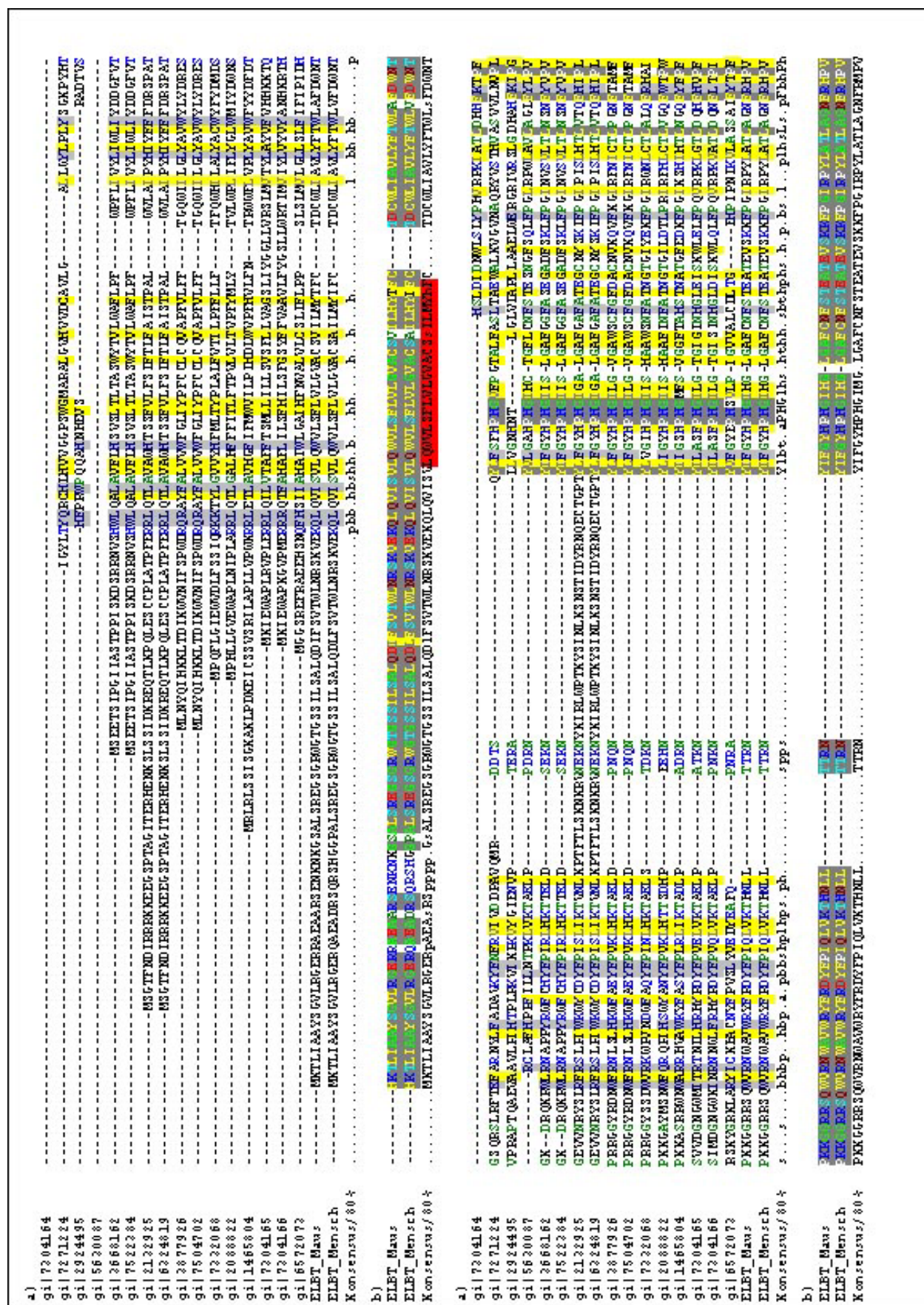
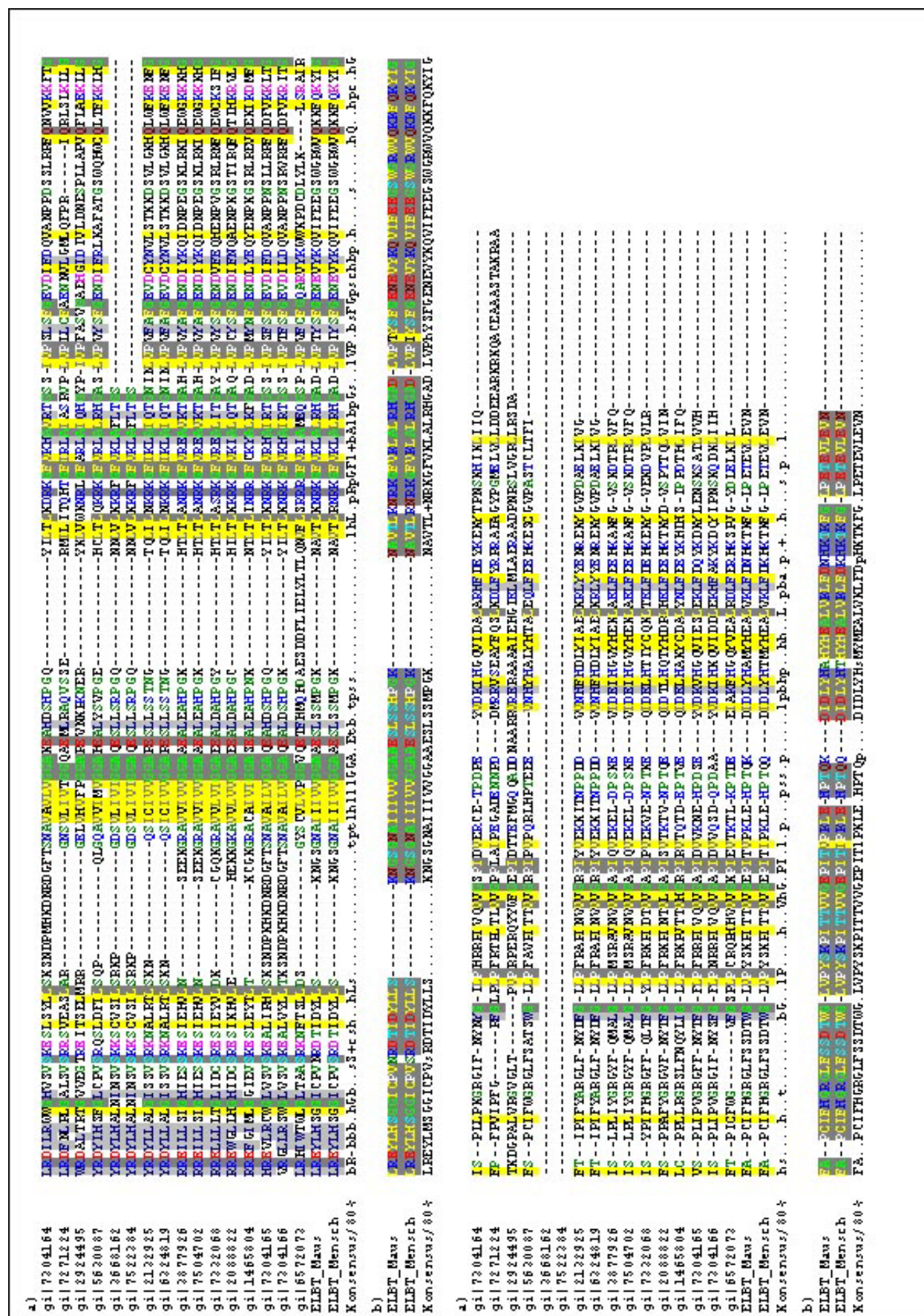


Abb.27.1: 1. Abschnitt des Sequenzvergleichs der ELBT-Proteinfamilie.



zu **Abb.27.1/2:** a) Vergleich aller identifizierter Mitglieder der ELBT-Proteinfamilie. b) Vergleich der humanen und murinen ELBT-Proteinsequenz. Die jeweils letzten Zeilen jedes Alignments repräsentieren die Konsensussequenz. Die Farbgebung der Aminosäuren wurde mit der CHROMA Software erstellt und gibt ein vorgegebenes Farbschema entsprechend der Aminosäureeigenschaften wieder. 80% der Aminosäuren einer Reihe mussten identisch sein oder zu einer der folgenden Gruppen gehören. Konsensus-Symbol / Farbe / Aminosäuren der Gruppe sind in Klammern wiedergegeben: negativ (-/rot/DE), hydroxyl (*hellblau/ST), aliphatisch (l/grau auf gelb/ILV), positiv (+/blau/HKR), sehr klein (t/grün/AGS), aromatisch (a/blau auf gelb/FHWY), geladen (c/Pink/DEHKR), klein (s/dunkelgrün/ACDGNPSTV), polar (p/hellblau/CDEHKNQRST), groß (b/Lila auf hellgelb/EFHIKLMQRWY), hydrophob (h/schwarz auf gelb/ACFGHILMTVWI). Der Einlettercode für die Aminosäuren ist im Anhang (G.5) wiedergegeben. Nach Vorhersage von TMHMM Version 2.0 bilden die Aminosäuren 73-95 von ELBT_Mensch eine Transmembran-Helix und sind im entsprechenden Konsensus rot markiert.

Neuste Literaturhinweise über ELBT (Stand Oktober 2001):

ELBT wurde als Gen DGAT2 einer Acyl CoA:Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) beschrieben und einer neuen DGAT-Genfamilie zugeordnet (Cases et al., 2001). Identifiziert wurde DGAT2 über die Homologie zu DGAT aus dem Pilz *Mortierella rammaniana* (Lardizabal et al., 2001). DGAT2, das keine Homologien zu DGAT1 zeigt, wurde in Insektenzellen exprimiert und zeigte eine Stimulation der Triglycerin-Synthese. Dadurch wurde die vorangegangene Hypothese von ELBT als Acyltransferase und die zusammengefasste neue Proteinfamilie bestätigt. Die in der Publikation beschriebenen weiteren humanen und murinen Mitglieder wurden in dieser Arbeit nicht identifiziert. Die in der TMHMM-Analyse vorhergesagte Transmembrandomäne wurde auch in der oben genannten Referenz beschrieben.

C.4 Identifizierung von neuen Kandidatengenen in 11q12-q23 mittels der positionalen Strategie

Im genomweiten Ansatz der in-silico Expressionsanalyse mit den schon beschriebenen Genen aus der chromosomalen Region 11q wurden nach dem elektronischen Northern differenziell exprimierte Gene chromosomal kartiert. Im Gegensatz dazu sollten bei der positionalen Strategie möglichst viele Gene aus der Region 11q über AUTEX identifiziert und assembliert werden, um sie anschließend im elektronischen Northern zu analysieren. Für diese systematische in-silico Expressionsanalyse von Transkripten aus der chromosomalen Region 11q12-q23 wurden 968 STS-Markern zwischen dem proximalen Marker RH13699 in 11q12 und dem distalen Marker RH27416 in 11q23 über AUTEX verlängert und im elektronischen Northern ausgewertet. Die Sequenzen von 921 STS-Marker aus der "GenMap99"-Datenbank konnten durch AUTEX mit Hilfe der EST-Datenbanken verlängert werden. Nach der Eliminierung von identischen Sequenzen resultierte ein nicht-redundantes Set von 563 assemblierten Sequenzen, die jeweils putative Gene aus dieser chromosomalen Region repräsentieren. Die in-silico Expressionsanalyse durch den elektronischen Northern ergab 30 differenziell exprimierte Gene in den Brustgewebe-Bibliotheken (Tumor- gegen Normalgewebe) unter Berücksichtigung der definierten Signifikanzschwelle ($P\text{-Wert} < 0,05$). Von den 30 im Brustgewebe differenziell exprimierten Genen waren verglichen mit dem Brust-Normalgewebe 19 im Tumor überexprimiert und 11 im Tumor unterexprimiert (Tab.19). Die meisten der identifizierten Gene stellten bekannte Gene dar. Einige der im genomweiten Ansatz identifizierten Gene wie ELBT, Frizzled 4, CLNS1A oder YAP65 aus 11q12-q23 wurden auch in diesem positionalen Ansatz gefunden. Den in-silico differenziellen Genen gegenübergestellt wurden 21 LOH-Marker und 9 Amplifikations-Marker (Gene), die innerhalb dieser chromosomalen Region 11q12-q23 lokalisiert waren und für die in primären Brusttumoren entsprechende Aberrationen beschrieben worden sind (Tab.19). Zusammen mit den 30 in-silico differenziellen Gene wurden die LOH- und Amplifikations-Marker physikalisch neu kartiert, wobei die annotierte genomische Sequenzdatenbank der UCSC (Stand Juni 2001) verwendet wurde. Die angegebenen physikalischen Bereiche (Position in Mb) bezogen sich auf die Ausdehnung der BAC-Sequenzen, auf denen die Gene und STS-Marker lokalisiert wurden. Dadurch konnten neben der Abfolge auch die ungefähren Abstände der potenziell tumorassoziierten Gene und aberranten Loci wiedergegeben werden.

Tab. 19: Auflistung der in-silico Kandidatengene und beschriebenen aberranten STS-Marker für Brusttumore von proximal 11q12 nach distal 11q23 mit Angaben der zytogenetischen Bande und der physikalischen Position auf dem Chromosomenabschnitt in Megabasen (Mb). Die Spalte Expression/Aberration zeigt die charakteristischen Eigenschaften der differenziell exprimierten Gene und beschriebenen STS-Marker in den Brusttumoren (rotes Feld, auf: überexprimiert; grünes Feld, ab: unterexprimiert; rote Schrift, Amp: amplifiziert; grüne Schrift, LOH: Verlust der Heterozygotie) mit Angaben der Ergebnisse des elektronischen Northern (P-Wert<0,05) und der Aberrationsstudien (verschlüsselte Referenz, siehe Anhang G.2).

Nr.	Gen / STS-Marker	Expression / Aberration	Kartierung		eNORTHERN in Brust			Aberrationen in primären Brusttumoren		
			Bande	Position in Mb	Hits N	Hits T	Ratio T/N	Ratio	Fälle	Referenzen
1	Lipophilin B	auf	11q12.1	54,40 - 54,70	14	24	2,86	-	-	-
2	Mammaglobin 1	auf	11q12.1	54,40 - 54,70	51	98	3,13	-	-	-
3	Desmoyokin	ab	11q12.1	54,90 - 55,20	60	15	0,45	-	-	-
4	Transcobalamin 1	auf	11q12.3	60,70 - 60,90	1	6	11,11	-	-	-
5	CD 20 like precursor	ab	11q12.3	61,00 - 61,30	14	1	0,12	-	-	-
6	Lipophilin A	auf	11q13.1	63,00 - 63,30	0	4	n.d.	-	-	-
7	Nuclear RNA export factor 1	ab	11q13.1	64,10 - 64,50	18	3	0,30	-	-	-
8	Solute carrier family 3, member 2	auf	11q13.1	64,10 - 64,50	4	14	6,25	-	-	-
9	Retinoic acid receptor responder 3	auf	11q13.1	65,20 - 65,60	10	21	3,70	-	-	-
10	Cytochrome c oxidase subunit VIII	auf	11q13.1	65,70 - 66,00	2	7	6,25	-	-	-
11	FLJ22711	auf	11q13.1	66,30 - 66,80	1	6	11,11	-	-	-
12	Fau	auf	11q13.2	67,30 - 67,60	4	11	5,00	-	-	-
13	Heat shock protein 90	ab	11q13.3	67,70 - 68,00	232	102	0,72	-	-	-
14	Alpha gene sequence	ab	11q13.3	67,70 - 68,00	105	35	0,60	-	-	-
15	Protein kinase MLK-3	auf	11q13.3	67,90 - 68,10	1	6	11,11	-	-	-
16	Non-muscle type cofilin 1	auf	11q13.3	68,30 - 68,50	9	19	3,70	-	-	-
17	FLJ21749	auf	11q13.3	71,40 - 71,70	0	5	n.d.	-	-	-
18	FLJ20853	auf	11q13.3	71,40 - 71,70	1	5	9,09	-	-	-
19	Glutathione S-transferase pi 1	Amp	11q13.4	71,60 - 71,90	-	-	-	5%	13 / 239	1
20	Deleted in oral cancer-related 1	auf	11q13.4	71,60 - 71,90	3	9	5,26	-	-	-
21	Aldehyde dehydrogenase 8	auf	11q13.4	71,60 - 71,90	5	14	5,00	-	-	-
22	D11S97	Amp	11q13.4	73,40 - 73,60	-	-	-	17%	86 / 514	1, 2
23	Cyclin D1 (PRAD1)	Amp	11q13.4	73,90 - 74,20	-	-	-	15%	373 / 2451	1 - 8
24	CCND1 / FGF3	Amp	11q13.4	73,90 - 74,20	-	-	-	16%	317 / 1993	9 - 12
25	Fibroblast growth factor 4	Amp	11q13.4	73,90 - 74,20	-	-	-	14%	231 / 1632	1, 4, 8, 13 - 16
26	FGF4 / FGF3	Amp	11q13.4	73,90 - 75,60	-	-	-	17%	49 / 292	17
27	Fibroblast growth factor 3	Amp	11q13.4	75,40 - 75,60	-	-	-	14%	447 / 3311	1, 4 - 8, 13, 15, 16, 18 - 25
28	Fibroblast growth factor 3	LOH	11q13.4	75,40 - 75,60	-	-	-	22%	32 / 143	23, 26, 27
29	Amplaxin	Amp	11q13.4	74,80 - 75,10	-	-	-	11%	146 / 1350	1, 12
30	Protein phosphatase methylesterase-1	auf	11q13.4	78,90 - 79,20	1	5	9,09	-	-	-
31	ELBT	ab	11q13.5	80,50 - 80,80	24	3	0,22	-	-	-
32	Death associated protein 4	ab	11q13.5	81,10 - 81,40	10	0	n.d.	-	-	-
33	GARP	Amp	11q13.5	81,30 - 81,60	-	-	-	12%	66 / 544	1, 7
34	Chloride channel regulatory protein 1A	auf	11q14.1	82,50 - 82,80	18	22	2,17	-	-	-
35	D11S901	LOH	11q14.1	87,10 - 87,40	-	-	-	30%	16 / 54	28, 29
36	Unbekannt	auf	11q14.1	88,60 - 88,80	0	3	n.d.	-	-	-
37	Clathrin assembly protein	ab	11q14.2	91,70 - 92,00	25	4	0,29	-	-	-
38	Frizzled 4	ab	11q14.2	92,60 - 92,80	14	1	0,12	-	-	-
39	D11S4175	LOH	11q14.3	96,40 - 96,60	-	-	-	34%	24 / 70	30
40	D11S1342	LOH	11q14.3	96,60 - 96,80	-	-	-	40%	4 / 10	31
41	D11S873	LOH	11q14.3	98,60 - 98,90	-	-	-	46%	5 / 11	29
42	D11S29	LOH	11q14.3	98,70 - 100,00	-	-	-	38%	60 / 160	31, 32
43	Hypothetical protein HSPC148	auf	11q21	101,60 - 102,00	0	3	n.d.	-	-	-
44	D11S35	LOH	11q22.1	108,60 - 108,90	-	-	-	39%	64 / 165	26, 27, 28, 31
45	D11S940	LOH	11q22.1	109,30 - 109,50	-	-	-	31%	11 / 36	31
46	Yes-associated protein	ab	11q22.1	109,90 - 110,20	26	6	0,41	-	-	-
47	Matrix metalloproteinase 7	ab	11q22.2	110,30 - 110,60	18	3	0,30	-	-	-
48	D11S2000	LOH	11q22.3	113,80 - 114,00	-	-	-	43%	3 / 7	31
49	D11S1325	LOH	11q22.3	113,90 - 114,10	-	-	-	33%	30 / 91	33
50	D11S1778	LOH	11q22.3	116,40 - 116,70	-	-	-	37%	294 / 791	33, 34
51	D11S1294	LOH	11q22.3	116,50 - 116,70	-	-	-	43%	258 / 607	33, 34
52	D11S927	LOH	11q22.3	118,60 - 118,90	-	-	-	39%	185 / 472	27, 33, 34
53	D11S1391	LOH	11q23.1	119,10 - 119,30	-	-	-	37%	38 / 97	36, 37
54	D11S1347	LOH	11q23.1	120,80 - 121,20	-	-	-	37%	46 / 123	33
55	D11S897	LOH	11q23.1	121,60 - 121,80	-	-	-	36%	9 / 25	29, 31
56	D11S528	LOH	11q23.2	123,30 - 123,60	-	-	-	38%	16 / 42	26, 31
57	Apolipoprotein C-III	LOH	11q23.3	126,20 - 126,30	-	-	-	44%	231 / 529	28, 33, 38, 39
58	D11S976	LOH	11q23.3	127,50 - 127,70	-	-	-	24%	43 / 182	32
59	CD3D antigen	LOH	11q23.3	127,80 - 128,10	-	-	-	27%	15 / 56	29, 31
60	D11S925	LOH	11q23.3	131,10 - 131,30	-	-	-	31%	27 / 87	27

Ein Vergleich der in-silico Kandidatengene mit den aberranten Regionen ermöglichte die Zuordnung von in Tumoren geringer exprimierten Genen als potenzielle Kandidatengene für spezifische LOH-Regionen sowie die Zuordnung von in Tumoren überexprimierten Genen als potenzielle Kandidatengene für beschriebene amplifizierte Chromosomenabschnitte. Desweiteren ließen sich Gencluster identifizieren, in deren chromosomalen Bereichen bisher keine Aberrationen beschrieben worden sind (Abb.28).

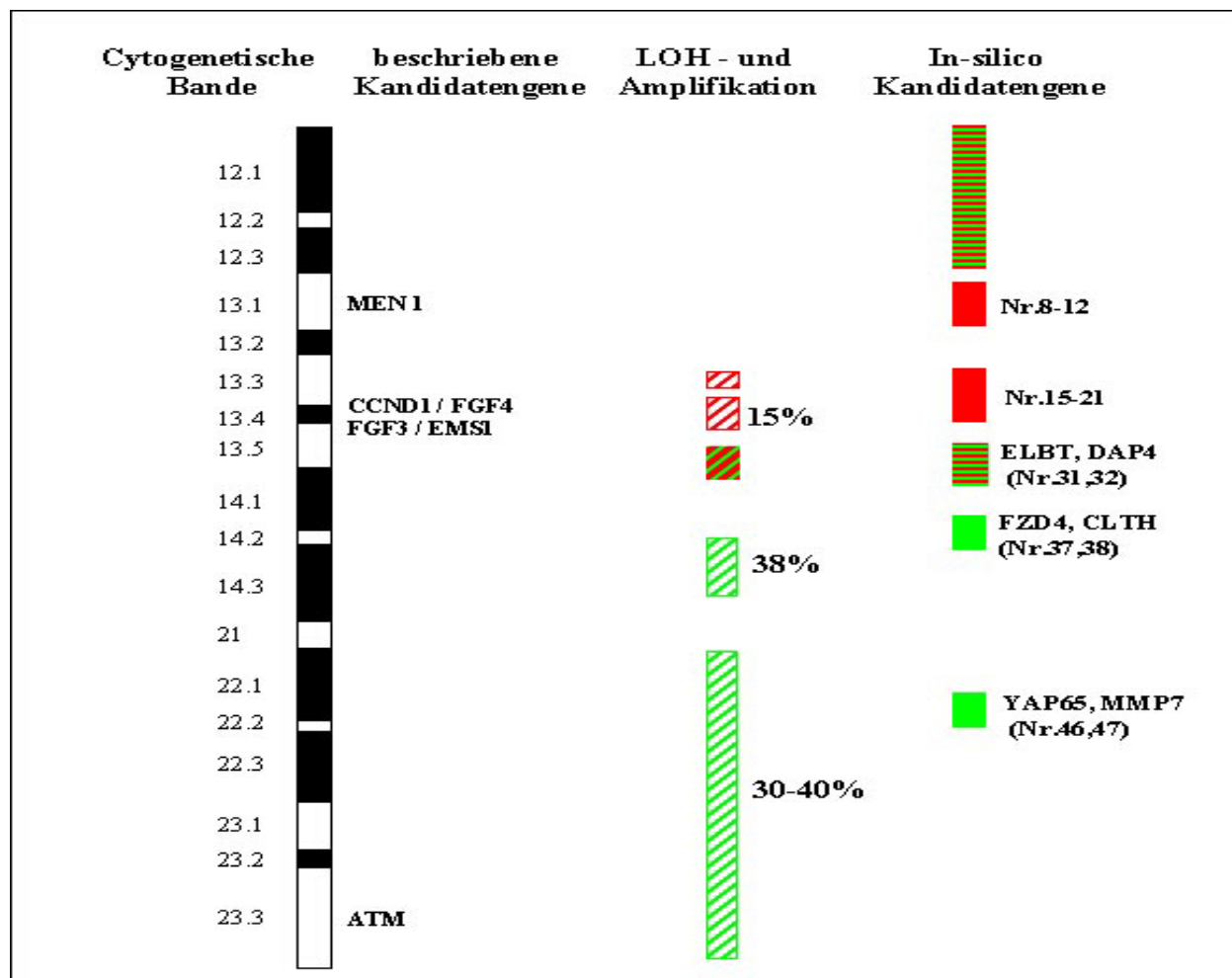


Abb.28: Vergleich der Lokalisation beschriebener aberranter Loci (grüne quergestreifte Balken = LOH-Region; rote quergestreifte Balken = amplifizierte Region) und der über den positionalen Ansatz identifizierten in-silico Kandidatengene (grüne Balken= im Tumor herunterreguliert; rote Balken= in Tumor hochreguliert). Die Kandidatengene bzw. Nummern entsprechen den Angaben der Tab.19. Die Gene MEN1, CCND1, FGF3, FGF4, EMS1 und ATM stellen schon beschriebene tumorassoziierte Gene dar.

Im proximalen Abschnitt 11q12.1-q13.3 wurden mehrheitlich Gene identifiziert, die sich im elektronischen Northern als überexprimiert in Brusttumoren zeigten. Mit Lipophilin A, Lipophilin B und Mammaglobin 1 (MGB1) gehören drei dieser Gene der Uteroglobulin-Familie an, wobei für MGB1 eine Überexpression in Brusttumoren bereits beschrieben

worden ist (Watson et al., 1996). Ein distinkte signifikante Anhäufung von überexprimierten Genen (Tab.19: Nr.8-12) wurde in 11q13.1 lokalisiert, wobei keines dieser Gene im Zusammenhang mit der Entstehung von Brusttumoren in Verbindung gebracht worden ist. Auf der DNA-Ebene wurden in diesem proximalen Abschnitt von 11q keine Beschreibungen über Amplifikationen in Brusttumoren gefunden, die auf ein tumorförderndes Gen schließen lassen. Distal an diesem Gencluster ist MEN1 als Tumorsuppressorgen für familiäre Neoplasien lokalisiert. Die häufigste in Brusttumoren amplifizierte Region (ca. 15%) wurde in 11q13.4 lokalisiert, für die mit Cyclin D1, FGF3 und FGF4 bereits involvierte Gene bekannt sind. Proximal zu dieser Region wurden in 11q13.3-q13.4 weitere Gene (Nr.15-18, 20, 21) identifiziert, die in-silico in Brusttumoren überexprimiert waren und weitere Kandidatengene für dieses Amplikon darstellen. Die Gene ELBT und DAP4 (Nr.31, 32), die schon im genomweiten Ansatz identifiziert wurden, lagen distal des beschriebenen Amplikons in einer Region für die sowohl LOH als auch Amplifikationen beschrieben worden ist. Der Chloridkanal CLNS1A (Nr.34), welcher in Brusttumoren als überexprimiert identifiziert wurde, kartierte in geringer Distanz (ca. 1Mb) zum Gen GARP, das in 12% der Brusttumoren als amplifiziert beschrieben worden ist. Im distalen Bereich der untersuchten Region 11q12-q23 wurden in der Literatur gehäuft Deletionen beschrieben. Dabei konnten für zwei distinkte LOH-Regionen Kandidatengene aus dem in-silico Ansatz identifiziert werden. Die beiden Gene CLTH und Frizzled 4 (Nr.37, 38) in 11q14.2 waren im elektronischen Northern signifikant in Brusttumoren herunterreguliert und kartierten proximal (ca. 4Mb) zu der beschriebenen LOH-Region in 11q14.3 (Nr.39-42; LOH in ca. 38% der Brusttumore). Als mögliche Tumorsuppressorgen-Kandidaten für die LOH-Region in 11q22.1 (D11S940, D11S35) konnten in geringem physikalischen Abstand (ca. 1Mb) die distal lokalisierten Gene YAP65 und MMP7 (Nr.46, 47) identifiziert werden. Beide Gene zeigten sich im elektronischen Northern als signifikant im Brusttumor herunterreguliert. In der chromosomalen Region 11q22.3-q23.3 ergaben sich nach Auswertung der LOH-Studien über eine große Distanz von fast 20Mb (D11S2000-D11S925) Deletionen in 35-40% der Brusttumore. In diesem Bereich konnten keine neuen Kandidatengene über die in-silico Expressionsanalyse identifiziert werden.

C.5 Beschreibung der Kandidatengene in 1q32-q41

Aus dem genomweiten Ansatz wurden, neben der Region 11q12-q23, die differenziell exprimierten Gene aus der Region 1q32-q41 weiter untersucht. Aufgrund der schlechteren genomischen Charakterisierung der Region 1q und der geringen Vergleichsdaten aus LOH- und Amplifikationsstudien über die Tumore erfolgte die für die Region 11q durchgeführte positionale Strategie nicht für die Region 1q.

C.5.1 Validierung aller in-silico Kandidatengene in 1q32-q41

In der chromosomalen Region 1q32-q41 konnten fünf Gene identifiziert werden, die nach der in-silico Expressionsanalyse in Brust- oder Ovarialtumoren differenziell exprimiert waren. Vier Gene zeigten nach der Annotation durch die Nukleinsäure- und Protein-Datenbanken Identitäten zu bereits beschriebenen Genen (Tab.20).

Tab. 20: Beschreibung der in-silico differenziellen Gene aus der chromosomalen Region 1q32.q41. Die Angabe der Signifikanz (E-Wert) bezieht sich auf das Ergebnis des Vergleichs der assemblierten Sequenz mit der Nukleinsäure-Datenbank (BLASTN).

Gene in 1q32-q41	Gene Abkürzung	Genbank- eintrag	Funktion	Referenz
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha isoform	PPP2R5A	gi5453949	Interaktion mit APC; inhibitiert β -catenin über wnt-Signalweg	McCright et al., 1996; Seeling et al., 1999
ETS-related transcription factor ERT / ELF3	ERT / ELF3	gi2338755	Transkriptionsfaktor der ETS-Familie; epithelspezifisch	Brembeck et al., 2000; Chang et al., 2000
Homologie zu: RAT mRNA for calpain	putatives Calpain	gi441199	Calpaine: Ca^{2+} -aktivierte Protease reguliert Ca^{2+} -abhängige Signalwege des Zellzyklus	Sato et al., 2001
Decay accelerating factor DAF	DAF / CD55	gi181464	Hemmung des Komplement-systems; Interaktion mit CD97	Aust et al., 1997; Hamann et al., 1998
Hypothetical protein HSPC186	HSPC186	gi7106761	unbekannt	

Eines der identifizierten Gene zeigte signifikante Ähnlichkeiten zu einem Calpain der Ratte (gi441199) und wurde in dieser Arbeit als putatives Calpain bezeichnet. Die allgemeinen Angaben über die Funktion bezieht sich dabei auf die Proteinfamilie der Calpaine, zu der das putative Calpain ein potenziell neues Mitglied darstellt. Für die Gene PPP2R5A, ELF3 und DAF lagen Literaturhinweise vor, die aufgrund ihrer Funktion für einen möglichen Einfluss in die Karzinogenese sprechen. Zum Gen HSPC186 gab es ausser dem Sequenzeintrag in der Datenbank keine weiteren Informationen zur möglichen Funktion des Proteins.

Alle fünf Gene wurden bei der chromosomalen Lokalisation aufgrund der identifizierten STS-Marker in die Region 1q32-q41 kartiert, die in Brust- und Ovarialkarzinomen häufig als amplifiziert gefunden wurden (Tab.21). Das Gen PPP2R5A wurde über Radiation Hybrid Mapping und nach den Einträgen der annotierten humanen Genomsequenz in 1q32.3 kartiert, wohingegen dieses Gen in der Literatur in 1q41 lokalisiert wurde. Mit dem Gen ELF3 wurde ein Gen in 1q32 identifiziert, das zusammen mit MDM4 als mögliche Kandidatengene für dieses Amplikon beschrieben worden sind (Abb.29). Im elektronischen Northern zeigten alle Gene hinsichtlich Brust oder Ovar eine signifikante Überexpression im Tumor gegenüber dem Normalgewebe (Tab.22). Die Gene ELF3, DAF und das putative Calpain waren sowohl in Brust- als auch in Ovarialtumoren überexprimiert, die Gene PPP2R5A und HSPC186 zeigten in-silico in Brusttumoren eine signifikante Überexpression. Das beobachtete Expressionsverhalten dieser Gene korreliert mit den beschriebenen genomischen Veränderungen, dass es sich bei der chromosomalen Region 1q32-q41 um eine amplifizierte DNA-Region in verschiedenen Tumoren handelt und dort tumorassoziierte Gene vermutet werden.

Tab. 22: Ergebnisse des elektronischen Northern der Gene in 1q32-q41 bezüglich der differentiellen Expression in Brust- und Ovargewebe.

Gene in 1q32-q41	Gewebetyp	Normalgewebe		Tumorgewebe		Verhältnis T/N	P-Wert α	Signifikanz in %
		Treffer	Bibliotheks-Größe	Treffer	Bibliotheks-Größe			
PPP2R5A	Brust	7	120725	10	67582	2.56	0.0732	92.7
	Ovar	4	33687	0	41736	-	0.0394	96.1
ERT / ELF3	Brust	10	120725	23	67582	3.85	0.00023	100.0
	Ovar	3	33687	11	41736	2.94	0.107	89.3
Putatives Calpain	Brust	2	120725	6	67582	5.00	0.0598	94.0
	Ovar	0	33687	6	41736	-	0.0369	96.3
DAF / CD55	Brust	6	120725	9	67582	2.50	0.107	89.3
	Ovar	0	33687	5	41736	-	0.0697	93.0
HSPC186	Brust	10	120725	15	67582	2.50	0.0366	96.3
	Ovar	0	33687	2	41736	-	1	0.0

Zur Verifizierung der in-silico Ergebnisse wurde die Expression der Gene auf dem cDNA-Array mit paarweise aufgebrauchten Normal- und Tumorproben von Brust- und Ovarialgeweben untersucht (Abb.30). Von den Genen PPP2R5A, dem putativen Calpain und HSCP186 wurde zuvor das Expressionsmuster auf dem Northernblot bestimmt. Die Gene PPP2R5A und HSCP186 zeigten eine ubiquitäre Expression in vielen Geweben, wobei bezüglich des HSCP186 neben dem Haupttranskript (1,5kb) weitere Spleissvarianten identifiziert werden konnten. Das putative Calpain zeigte eine sehr spezifische Expression im Dickdarm und korrelierte mit gewebespezifischen Calpainen wie nCL-2 und nCL-4 des Verdauungstraktes. Das Transkript des putativen

Calpains ergab in der Northernblot-Analyse eine Größe von ca. 7,5kb, wovon in der assemblierten Sequenz nur 1499bp repräsentiert waren (Tab.21). Der fehlende Teil der Sequenz des putativen Calpains konnte in dieser Arbeit nicht entschlüsselt werden. Die Sonden für die Gene ELF3 und DAF lagen für diese Arbeit bereits optimiert vor, so dass aufgrund der bereits beschriebenen Gewebeexpression nur die Ergebnisse der cDNA-Arrays dargestellt sind. Von den fünf untersuchten Genen ließ sich im cDNA-Array die Überexpression in den Brusttumoren signifikant ($T/N > 2$) für das Gen des putativen Calpains in sieben der neun Probenpaare (Abb.30; Nr.3-9) bestätigen. Die Gene HSCP186 und ELF3 zeigten eine signifikante Hochregulation der Transkription in nur zwei der neun Probenpaare (Nr. 1, 5 bzw. Nr.5, 6). Die Expressionanalyse der Gene PPP2R5A und DAF in den Brusttumoren des cDNA-Arrays ergaben ein heterogenes Ergebnis.

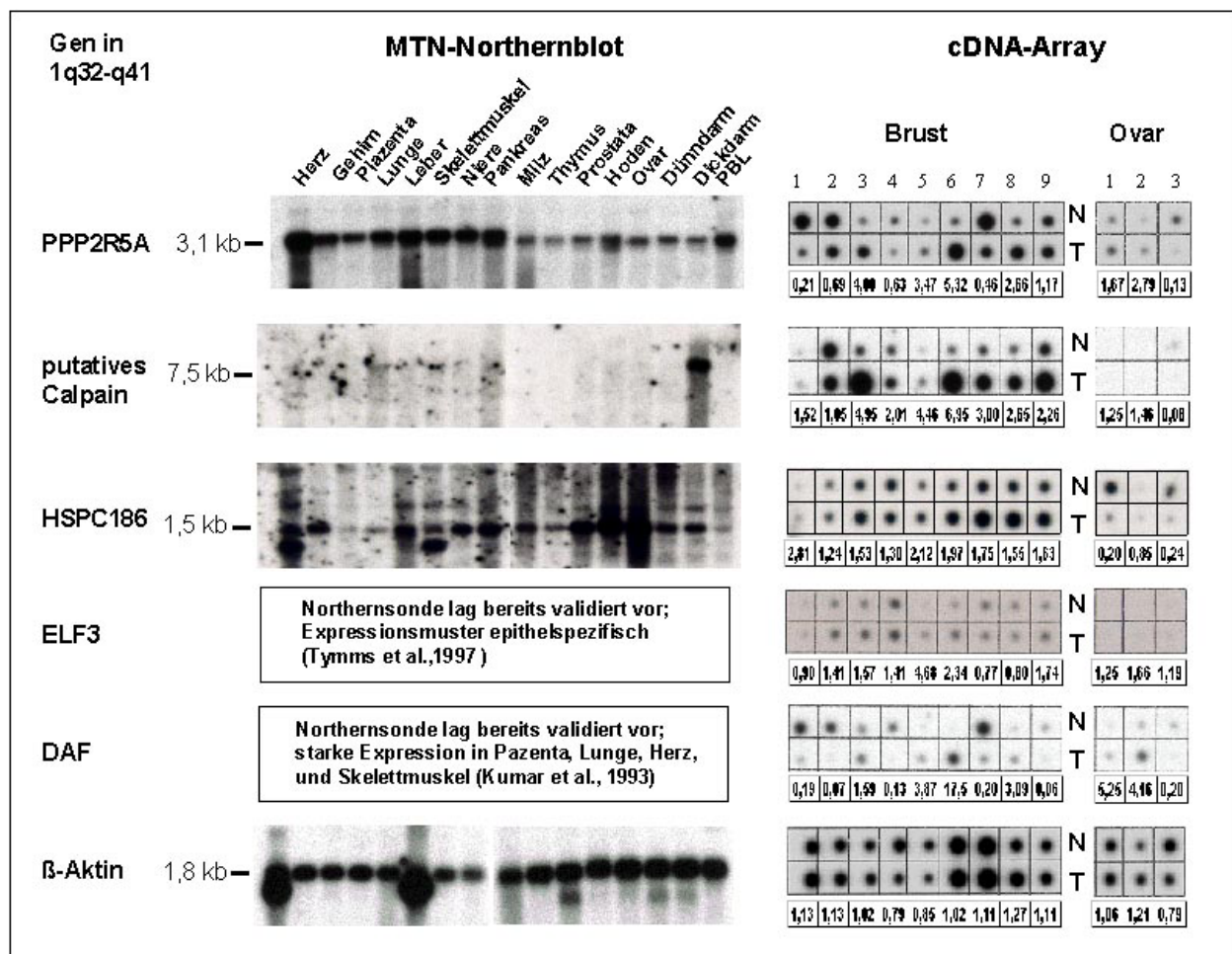


Abb.30: Übersicht über das Expressionsmuster der Gene aus 1q32-q41 im MTN-Northernblot (linke Bilderspalte) mit 16 verschiedenen Gewebetypen und im cDNA-Array (beide rechte Bildspalten) mit korrespondierenden Normal (N)- und Tumorzellen (T) von Brust- und Ovargewebe. Für die Gene ELF3 und DAF lagen die Sonden schon validiert vor und es sind nur die Hybridisierung des cDNA-Arrays dargestellt. Unter den cDNA-Arrays sind die Expressionsverhältnisse (T/N) angegeben.

Für das Gen PPP2R5A bestätigte sich die Überexpression im Tumor ($T/N > 2$) in vier der neun Brust-Probenpaare (Nr.3, 5, 6, 8), während zwei Probenpaare (Nr.1, 7) eine signifikant geringere Expression in den Tumoren ($T/N < 0,5$) zeigten. Im Falle des Gens DAF waren fünf der neun Probenpaare im Tumor signifikant niedriger exprimiert, während sich nur bei drei Probenpaaren eine verstärkte Expression in den Tumoren zeigte. Die in-silico identifizierte Hochregulation von DAF im Ovarialkarzinom bestätigte sich in zwei der drei Probenpaare (Nr.1, 2) auf dem cDNA-Array.

Das putative Calpain ließ sich nach diesen Expressionsexperimenten als potenziell tumorassoziiertes Gen bestätigen. Es konnte zu der kurzen Sequenz des Assemblies keine weitere Sequenz des großen Transkriptes, das sich aus dem Northernblot ergab, entschlüsselt werden. Dadurch konnte keine Aussage über eine translatierte Proteinsequenz getroffen werden. Für die Gene ELF3 und HSPC186 ließ sich die Hochregulation in Brusttumoren in der Mehrzahl der untersuchten Probenpaare nicht bestätigen. Die Expressionsverhältnisse der Gene DAF und PPP2R5A waren bezüglich der Probenpaare des cDNA-Arrays sehr heterogen, wobei sich im Falle des Gens PPP2R5A die Hochregulation in Brusttumoren aus dem elektronischen Northern tendenziell bestätigte.

C.5.2 Charakterisierung des potenziellen Onkogens PPP2R5A

Mit dem Gen PPP2R5A wurde ein potenzielles Onkogen im Amplikon 1q32 identifiziert, das aufgrund der Expressionsstudien in einer Fraktion von Brusttumoren überexprimiert war. Mit PPP2R5A wurde ein Gen identifiziert, das im "Wingless-Signalweg" involviert ist, der mit der Entstehung verschiedener Tumore in Verbindung gebracht worden ist. Die Ergebnisse des cDNA-Arrays zur Validierung der differentiellen Expression ergaben für PPP2R5A ein heterogenes Expressionsmuster. Um die differentielle Expression zu überprüfen, wurden für PPP2R5A quantitative Taqman-Analysen an mikrodisssezierten Brusttumoren und Normalepithelien der Brust durchgeführt. Desweiteren wurde die Lokalisation der Genexpression durch die RNA in-situ Hybridisierung in Brustgewebe-Paraffinschnitten ermittelt.

C.5.2.1 Geringe Expressionsunterschiede von PPP2R5A in Brusttumoren

Die Ergebnisse der Expression des Gens PPP2R5A in den mikrodisezierten Brusttumoren gaben die heterogenen Verhältnisse der Expression in den Probenpaaren des cDNA-Arrays wieder. Es konnten nach der Taqman-Analyse 17 Tumorproben und eine Normalepithelprobe ausgewertet werden (Tab.23).

Tab. 23: Auswertung der Taqman-Analyse zur Expression von PPP2R5A in den mikrodisezierten Brustgeweben.

Nr.	Histologie	Gen	CT (Mw)	Stabw	Gen	T (Mw)	Stabw	ΔCT	Stabw ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Level	- Fehler	+ Fehler
B1	IDC, grade 2	GAPDH	24,7	0,1	PPP2R5A	35,0	0,26	10,3	0,28	0,4	0,734	0,13	0,2
B2	IDC, grade 2	GAPDH	25,8	0,44	PPP2R5A	36,4	0,36	10,6	0,57	0,7	0,595	0,19	0,3
B3	IDC, grade 2	GAPDH	28,2	0,18	PPP2R5A	36,9	0,36	8,7	0,40	-1,1	2,158	0,53	0,7
B5	IDC, grade 2	GAPDH	25,9	0,22	PPP2R5A	35,2	0,01	9,3	0,22	-0,5	1,384	0,20	0,2
B6	IDC, grade 2	GAPDH	24,9	0,03	PPP2R5A	36,3	0,05	11,4	0,06	1,6	0,332	0,01	0,0
B7	IDC, grade 2	GAPDH	26,9	0,12	PPP2R5A	35,7	0,24	8,8	0,27	-1,1	2,083	0,35	0,4
B8	IDC, grade 3	GAPDH	26,6	0,08	PPP2R5A	36,1	0,47	9,5	0,48	-0,3	1,210	0,34	0,5
B9	IDC, grade 3	GAPDH	26,5	0,14	PPP2R5A	36,4	0,13	9,8	0,19	0,0	0,992	0,12	0,1
B10	IDC, grade 3	GAPDH	27,7	0,18	PPP2R5A	35,8	0,45	8,2	0,48	-1,7	3,171	0,90	1,3
B11	IDC, grade 3	GAPDH	28,8	0,19	PPP2R5A	39,9	0,21	11,0	0,28	1,2	0,425	0,08	0,1
B12	IDC, grade 3	GAPDH	31,3	0,06	PPP2R5A	39,3	0,59	8,0	0,59	-1,8	3,418	1,15	1,7
B14	ILC, grade 2	GAPDH	28,4	0,32	PPP2R5A	35,9	0,15	7,5	0,35	-2,3	4,902	1,07	1,4
B15	ILC, grade 2	GAPDH	27,3	0,45	PPP2R5A	36,4	0,30	9,1	0,54	-0,7	1,653	0,52	0,7
B16	ILC, grade 2	GAPDH	26,8	0,22	PPP2R5A	36,2	0,06	9,4	0,23	-0,4	1,326	0,19	0,2
B22	ILC, grade 2	GAPDH	25,3	0,41	PPP2R5A	37,7	0,13	12,4	0,43	2,6	0,165	0,04	0,1
B17	ILC, grade 3	GAPDH	24,1	0,29	PPP2R5A	35,8	0,34	11,7	0,45	1,9	0,266	0,07	0,1
B18	ILC, grade 3	GAPDH	28,5	0,1	PPP2R5A	38,4	0,55	9,9	0,56	0,1	0,924	0,30	0,4
B19	Normalepithel	GAPDH	28,8	0,55	PPP2R5A	38,6	0,27	9,8	0,61	0,0	1,000	0,35	0,5

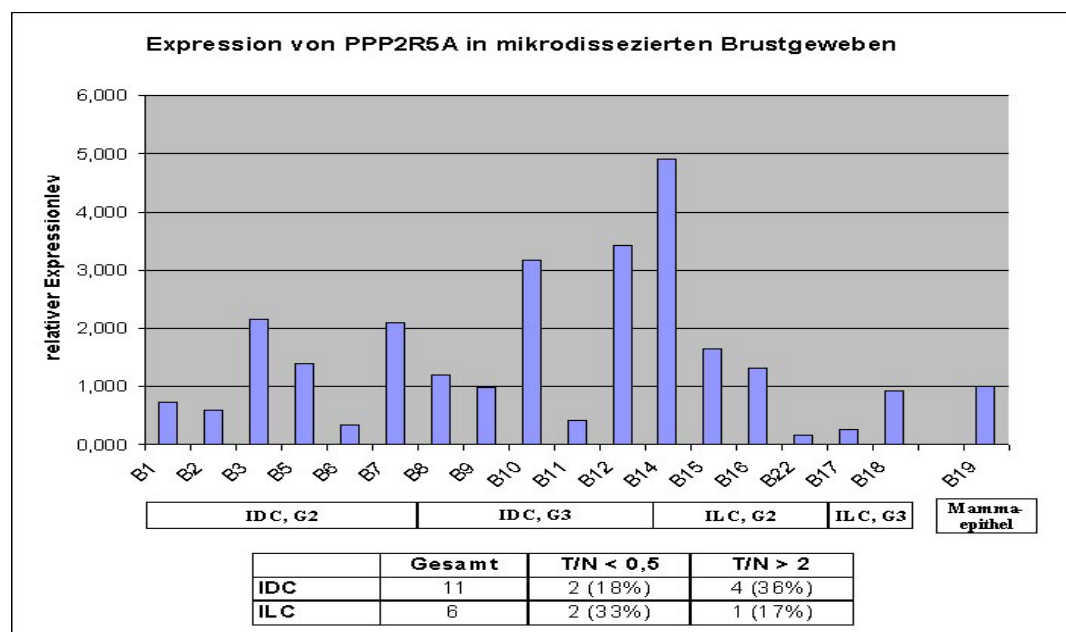


Abb.31: Übersicht der Expressionslevel von PPP2R5A in 17 mikrodisezierten Tumoren bezogen auf eine Normalepithelprobe (B19). Die Tabelle gibt die Fraktionen der Tumore nach IDC und ILC getrennt wieder, die differenziell exprimiert (Unterexpression: $T/N < 0,5$; Überexpression: $T/N > 2$) waren.

Im Vergleich der relativen Expression der Tumorproben zur Normalepithelprobe (B19) ergaben sich in 36% der IDCs eine mindestens zweifache Überexpression, in 18% der IDCs eine mindestens zweifache Unterexpression (Abb.31). Bei den ILCs bestätigte nur eine (17%) von sechs Proben die im elektronischen Northern vorhergesagte Überexpression, zwei Proben (33%) waren mindestens zweifach geringer exprimiert. Die getroffenen statistischen Aussagen müssen bei diesem Experiment aufgrund der einzelnen Normalepithelprobe relativiert und im Zusammenhang mit den vorangegangenen Studien betrachtet werden. Die Resultate der Expression von PPP2R5A in den mikrodisszierten Proben bestätigen das Expressionsmuster des cDNA-Arrays. Aus den Expressionsstudien resultierend ergab sich in etwa 30-40% der Tumore eine moderate Überexpression von PPP2R5A ($2 < T/N < 5$), während in ca. 20% der Tumore das Gen geringer exprimiert war ($0,2 < T/N < 0,5$).

C.5.2.2 Ubiquitäre Expression von PPP2R5A in verschiedenen Geweben

Parallel zu den Taqman-Analysen der mikrodisszierten Brusttumoren wurde die Expression von PPP2R5A in 22 verschiedenen humanen Organen und neun Tumorzelllinien untersucht (Tab.24).

Tab. 24: Auswertung der Taqman-Analyse zur Expression von PPP2R5A in 22 verschiedenen Normalgeweben und neun Zelllinien.

Name	Gen	CT (Mw)	Stabw	Gen	(Mw)	Stabw	Δ CT	Stabw Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Level	- Fehler	+ Fehler
Gehirn	GAPDH	21,1	0,23	PPP2R5A	25,8	0,28	4,7	0,36	2,2	0,23	0,05	0,06
Speicheldrüse	GAPDH	21,8	0,14	PPP2R5A	25,3	0,17	3,5	0,22	1,0	0,51	0,07	0,08
Schilddrüse	GAPDH	21,6	0,01	PPP2R5A	25,1	0,38	3,6	0,38	1,0	0,50	0,12	0,15
Magen	GAPDH	23,8	0,3	PPP2R5A	25,4	0,25	1,6	0,39	-1,0	1,98	0,47	0,61
Thymus	GAPDH	21,2	0,02	PPP2R5A	25,1	0,15	3,8	0,15	1,3	0,41	0,04	0,05
Uterus	GAPDH	22,0	0,24	PPP2R5A	24,8	0,13	2,8	0,27	0,2	0,85	0,15	0,18
Prostata	GAPDH	22,3	0,19	PPP2R5A	25,2	0,24	2,9	0,31	0,3	0,79	0,15	0,19
Skelettmuskel	GAPDH	19,3	0,25	PPP2R5A	25,1	0,17	5,9	0,30	3,3	0,10	0,02	0,02
Dünndarm	GAPDH	22,6	0,21	PPP2R5A	25,6	0,07	3,0	0,22	0,5	0,73	0,10	0,12
Herz	GAPDH	21,5	0,49	PPP2R5A	25,2	0,1	3,7	0,50	1,1	0,45	0,13	0,19
Placenta	GAPDH	23,2	0,04	PPP2R5A	26,1	0,34	2,9	0,34	0,3	0,81	0,17	0,22
Hoden	GAPDH	23,2	0,17	PPP2R5A	26,9	0,06	3,7	0,18	1,1	0,46	0,05	0,06
Milz	GAPDH	23,4	0,1	PPP2R5A	25,0	0,24	1,6	0,26	-1,0	1,98	0,33	0,39
Hypophyse	GAPDH	22,9	0,24	PPP2R5A	26,3	0,18	3,5	0,30	0,9	0,53	0,10	0,12
Pankreas	GAPDH	25,8	0,19	PPP2R5A	27,1	0,3	1,3	0,36	-1,3	2,40	0,52	0,67
Leber	GAPDH	23,7	0,24	PPP2R5A	25,4	0,24	1,7	0,34	-0,8	1,76	0,37	0,47
Brust	GAPDH	22,5	0,14	PPP2R5A	25,0	0,06	2,6	0,15	0,0	1,00	0,10	0,11
Lunge	GAPDH	23,2	0,15	PPP2R5A	24,6	0,13	1,5	0,20	-1,1	2,14	0,27	0,31
Lymphknoten	GAPDH	24,2	0,3	PPP2R5A	26,8	0,14	2,7	0,33	0,1	0,94	0,19	0,24
Dickdarm	GAPDH	23,3	0,11	PPP2R5A	25,9	0,35	2,6	0,37	0,1	0,95	0,21	0,27
Niere	GAPDH	23,2	0,05	PPP2R5A	26,5	0,09	3,2	0,10	0,7	0,63	0,04	0,05
Cervix	GAPDH	26,5	0,15	PPP2R5A	28,6	0,21	2,0	0,26	-0,5	1,44	0,24	0,28
MCF7	GAPDH	21,2	0,02	PPP2R5A	27,1	0,29	6,0	0,29	3,4	0,09	0,02	0,02
T47D	GAPDH	23,1	0,07	PPP2R5A	26,2	0,08	3,2	0,11	0,6	0,65	0,05	0,05
MDA231	GAPDH	21,2	0,11	PPP2R5A	27,0	0,11	5,8	0,16	3,3	0,10	0,01	0,01
BT474	GAPDH	21,4	0,1	PPP2R5A	26,4	0,12	4,9	0,16	2,4	0,19	0,02	0,02
MDA453	GAPDH	20,7	0,12	PPP2R5A	24,6	0,29	3,9	0,31	1,4	0,39	0,08	0,09
SKBR3	GAPDH	20,6	0,26	PPP2R5A	25,2	0,12	4,7	0,29	2,1	0,23	0,04	0,05
EB-2	GAPDH	19,7	0,16	PPP2R5A	26,4	0,12	6,7	0,20	4,1	0,06	0,01	0,01
PA-1	GAPDH	21,3	0,07	PPP2R5A	27,4	0,21	6,2	0,22	3,6	0,08	0,01	0,01
BG-1	GAPDH	21,0	0,16	PPP2R5A	28,2	0,01	7,2	0,16	4,6	0,04	0,00	0,00

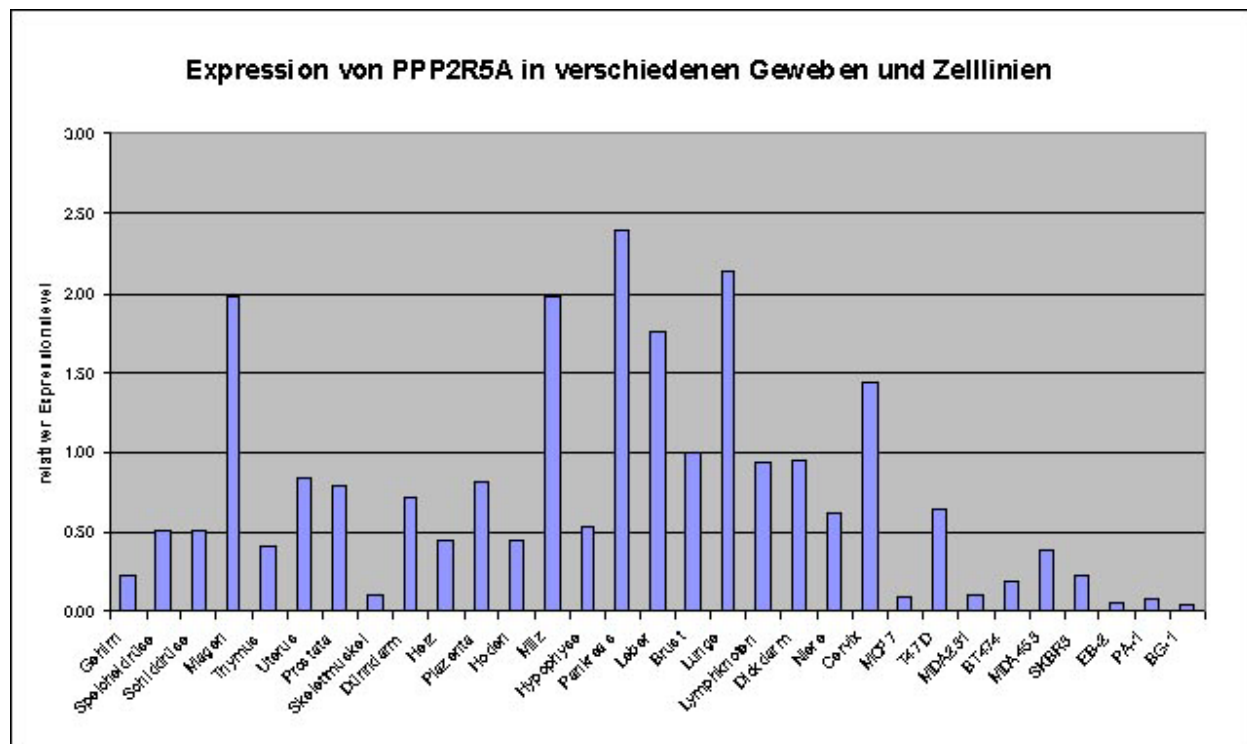


Abb.32: Darstellung der Expression von PPP2R5A in 22 unterschiedlichen Normalgeweben und neun Tumorzelllinien im Säulendiagramm.

Die Taqman-Analyse ergab die stärkste Expression in den Organen Pankreas, Lunge, Milz, Leber, Magen und Cervix. Die weiteren untersuchten Normalgewebe zeigten eine ähnlich starke bis zweifach geringere Expression von PPP2R5A gegenüber dem Brustgewebe als Referenzprobe. Die geringsten Expressionslevel wurden in Gehirn und Skelettmuskel festgestellt. Damit bestätigte sich das Ergebnis des elektronischen Northern und des Northernblots einer weitgehend ubiquitären Expression von PPP2R5A in den humanen Geweben (Abb.32). Die Brust-Tumorzelllinien zeigten bis auf die Zelllinie T47D gegenüber den meisten Normalgeweben eine deutlich schwächere Expression von PPP2R5A (Level<0,5). Die Expressionslevel der Ovarial-Tumorzelllinien (EB-2, PA-1, BG-1) waren nochmals deutlich geringer (Level<0,1) gegenüber den Brust-Tumorzelllinien.

C.5.2.3 RNA in-situ Hybridisierung zeigte die Expression von PPP2R5A sowohl im Tumor als auch im Normalepithel der Brust

Zur Durchführung der RNA in-situ Hybridisierung des Gens PPP2R5A auf Paraffinschnitten verschiedener Brustgewebe wurden aus dem genspezifischen Klon (AA486712) entsprechende RNA-Sonden mit einer Größe von 2,3kb präpariert (Abb.33). Die Hybridisierung der Antisense- und Sense-Sonden von PPP2R5A erfolgte

auf Paraffinschnitten einschließlich Normalepithelien der Brust, zehn invasiv duktales und sechs invasiv lobulären Karzinomen. Die Sense-Sonde als Negativ-Kontrolle ergab kein Expressionssignal auf den Gewebeschnitten, wodurch die Spezifität der Antisense-Sonde gewährleistet wurde. Die Hybridisierung mit der PPP2R5A-spezifischen Antisense-Sonde zeigte die Expression des Gens sowohl in den Normalepithelien der Brust, als auch in den verschiedenen Tumoren. In den Normalepithelien der Brust waren etwa 20-40% der Zellen positiv gefärbt (Abb.34). Es konnten in den verschiedenen Drüsenanteilen der Brust keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die Expression des Gens war neben dem abgebildeten unauffälligen Epithel auch in hyperplastischen Epithelien nachweisbar. Eine ebenso moderate, bis starke Expression ergab die Hybridisierung der invasiv duktales Tumoren (Abb.34). In dem abgebildeten Beispiel des IDCs sind weniger als 20% der Tumorzellen positiv. Dies entsprach der Expressionsstärke in ca. 50% der untersuchten invasiv duktales Karzinome. Weitere 50% der IDCs zeigten in ca. 20-40% der Tumorzellen eine Expression des Gens PPP2R5A. Ähnliche Expressionsverhältnisse ergaben sich bei der Untersuchung von den invasiv lobulären Karzinomen (Abb.35). Die Hybridisierung von vier der sechs ILCs ergaben ca. 20-40% positive Tumorzellen, wie im abgebildeten Beispiel. Dabei zeigte sich eine Expression von PPP2R5A nicht nur in den kompakten Tumorearealen, sondern auch in den kleineren Tumorzellhaufen, die durch Invasion einzelner Tumorzellen in Lymphgefäße, Fett- oder Bindegewebe entstanden sind. Quantitative Expressionsunterschiede hinsichtlich der Tumorprogression konnten in den untersuchten Präparaten nicht festgestellt werden.

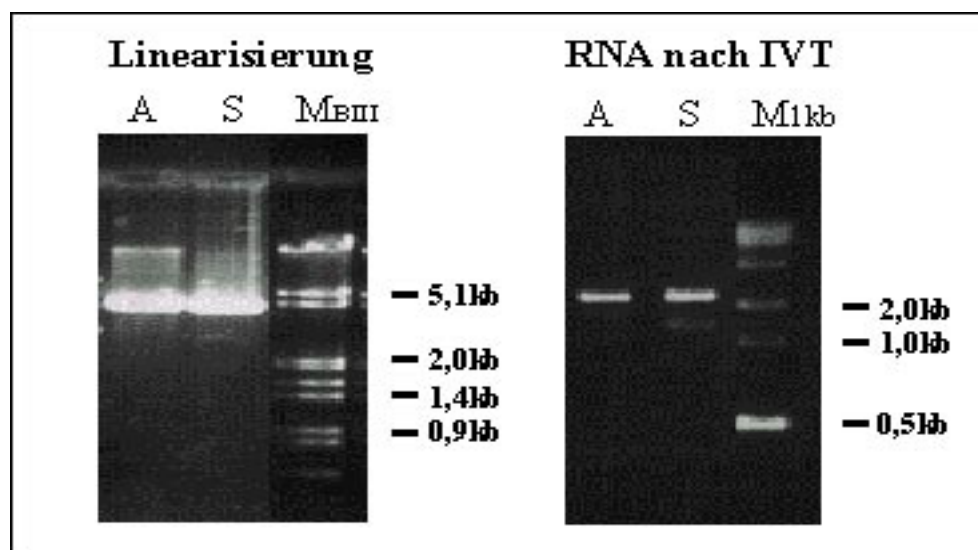


Abb.33: Sondenpräparation für die RNA in-situ Hybridisierung des Gens PPP2R5A. Für die Linearisierung und in-vitro Transkription wurde der Klon AA486712 eingesetzt.

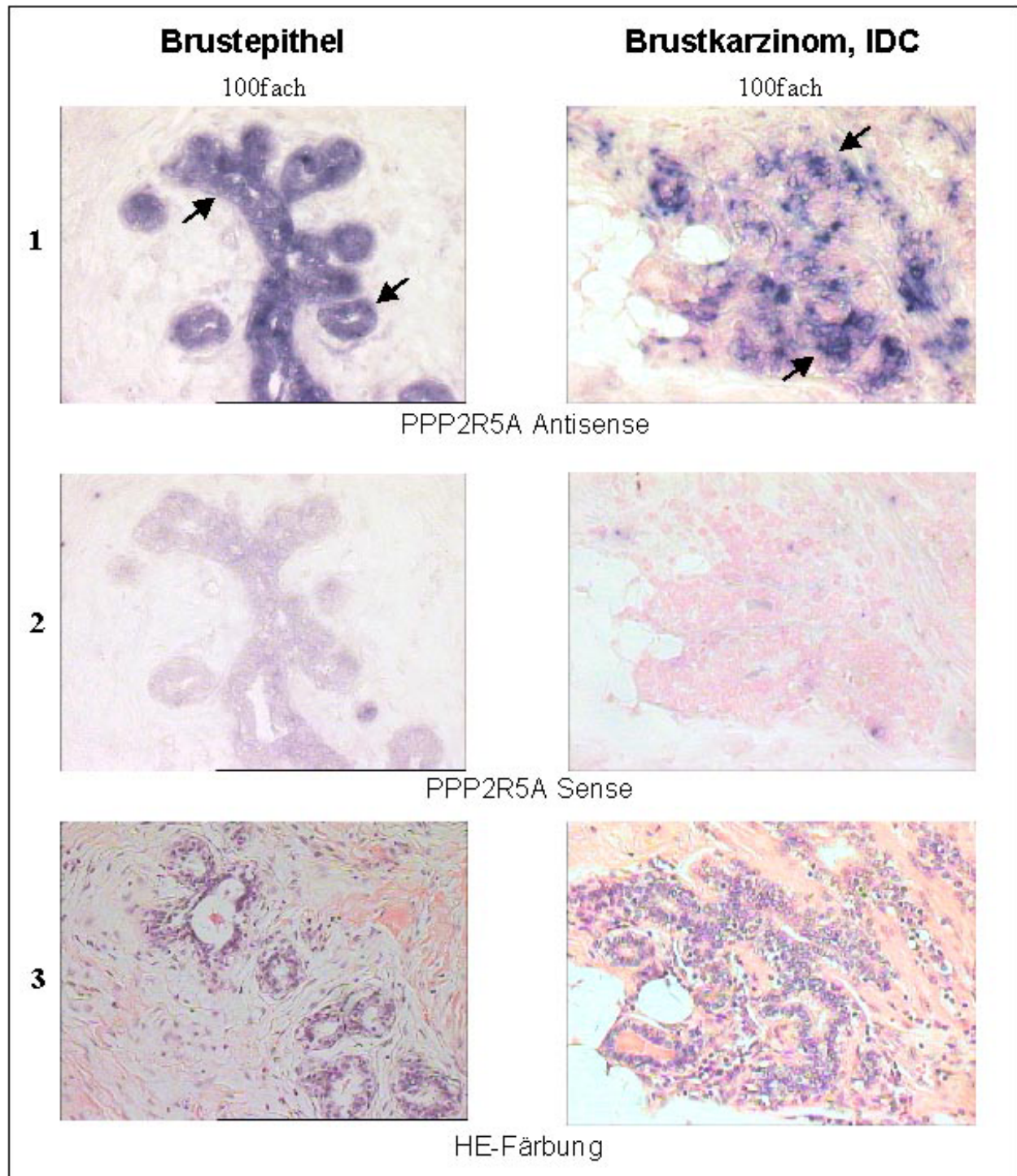


Abb.34: RNA in-situ Hybridisierung der PPP2R5A-Sonde auf Brustgewebe-Paraffinschnitte. Das Gen PPP2R5A ist sowohl in normalem Brustepithel (linke Bilderspalte, Pfeile), als auch in invasiv duktalem Karzinom (IDC, rechte Bilderspalte, Pfeile) exprimiert. Die Negativ-Kontrollpräparate zeigen keine Färbung (PPP2R5A Sense). In den HE-Schnitten sind die blaugefärbten Zellkerne erkennbar. Der HE-Schnitt des Normalepithels zeigt aufgrund der Entfernung zu den beiden hybridisierten Schnitten nicht mehr die gleiche Drüsenstruktur.

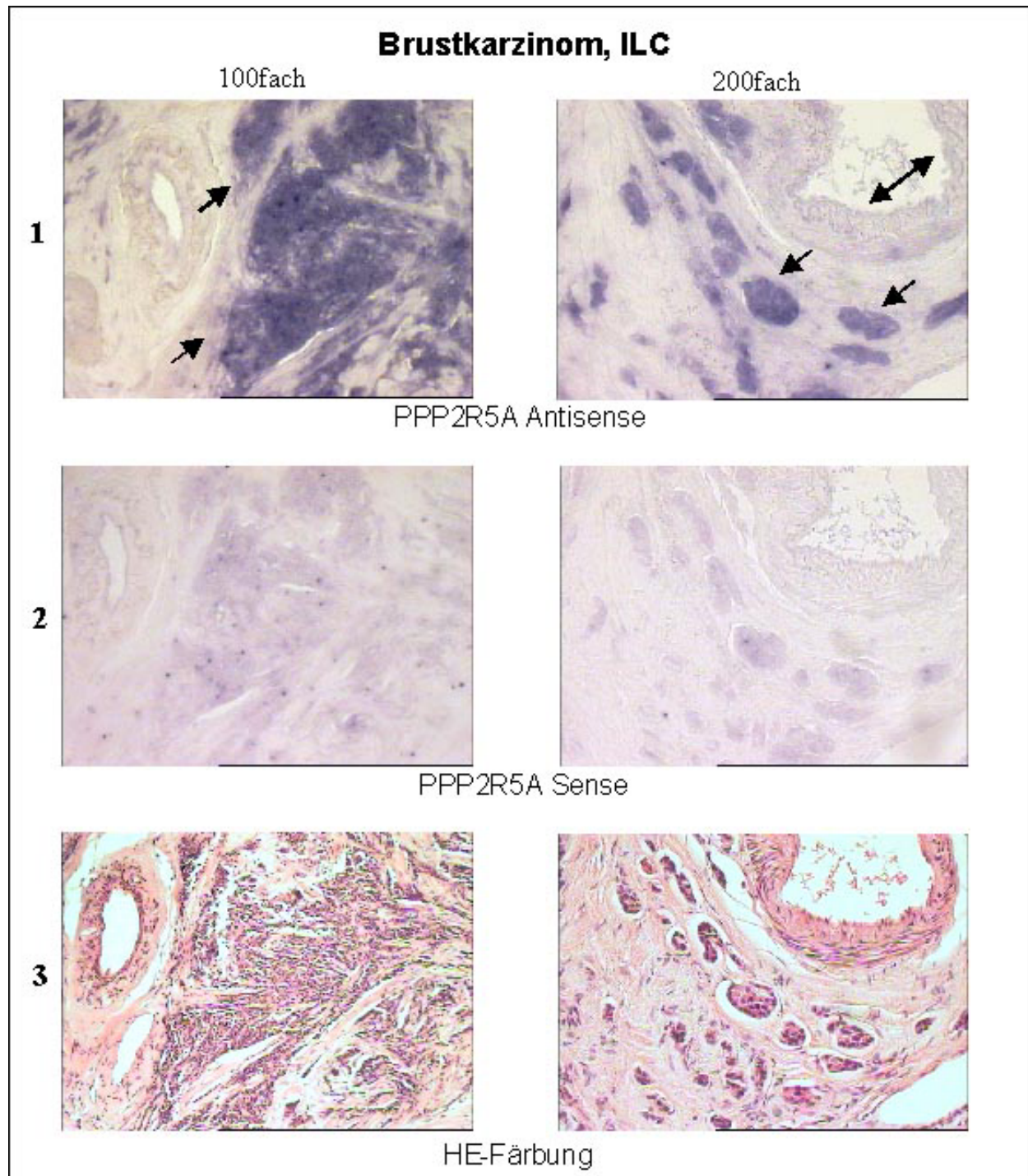


Abb.35: Die RNA in-situ Hybridisierung der PPP2R5A-Sonde ergab die Expression im invasiv lobulären Typ (ILC) des Brustkarzinoms. In der linken Bilderspalte sind die stark positiven kompakten Tumormassen des ILC dargestellt (Pfeile). Eine Expression von PPP2R5A zeigte sich auch in kleineren Tumorzellhaufen in Lymphgefäßen und im Bindegewebe (rechte Bilderspalte, Pfeile; Doppelpfeil markiert venöses Gefäß).

D Diskussion

D.1 Bewertung der in-silico Expressionsanalyse als Methode zur Identifizierung tumorassoziierter Gene

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von neuen tumorassozierten Genen aufgrund ihrer differentiellen Expression in Brust- und Ovarialkarzinomen. Die Karzinogenese stellt einen sehr komplexen, weitgehend noch unbekannten Prozess der Fehlregulation zellulärer Stoffwechselwege dar, in dessen Verlauf eine Vielzahl von Genen involviert sind. Es wurden bereits Gene beschrieben, die durch ihren proliferationshemmenden Charakter die Entartung der Zellen verhindern oder durch ihren onkogenen Charakter die Tumorentstehung fördern. Bei den klassisch definierten Tumorsuppressorgenen (TSG) wie RB, TP53, APC und WT1 sowie Onkogenen wie RAS, MYC und BCL1 wurden Mutationen in der genomischen Sequenz für verschiedene Tumore festgestellt (Bishop, 1991; Sager et al., 1994; Cooper, 1995; Weinberg, 1996). Veränderungen auf DNA-Ebene können die Aktivität des Proteins beeinflussen, aber auch zu einer Deregulation der Genexpression in den Tumoren führen. Dem gegenüber steht eine zahlreicher werdende Gruppe von Genen, die durch Veränderung ihrer Expressionsstärken signifikante Assoziationen zur Tumorentstehung zeigen, ohne dass Veränderungen auf der DNA-Ebene vorhanden sind. Beispiele für solche Gene sind Maspin, CDKN2A oder EGFR (Sager et al., 1997; Zhang et al., 1998). Als möglicher Grund für die veränderte Genexpression wird der Einfluss von TSG und Onkogenen angenommen, die die Transkription dieser Gene über Signalübertragungswege regulieren. Die quantitative Analyse der Genexpression in Tumoren sollte es ermöglichen, neben den Genen mit genomischen Veränderungen auch die Gene zu identifizieren, die sekundär über Veränderungen ihrer Transkriptionsregulation in die Tumorentstehung und -progression involviert sind.

Aufgrund der vermuteten großen Zahl von Genen, deren Proteine in den für die Tumorentstehung wichtigen Signalwegen wie Zellteilung, DNA-Reparatur, Angiogenese, Seneszenz und Apoptose mitwirken, wurden Methoden entwickelt, um in einem Vorscreening die Expression möglichst vieler Gene zu untersuchen. Zahlreiche Studien basieren auf bereits etablierte Methoden wie Differential Display, subtraktive Hybridisierung oder SAGE. Eine aktuelle Methode stellt die Hybridisierung chipbasierter Mikroarrays dar, mit deren Hilfe in den Tumoren ein Expressionsprofil über mehrere tausend Gene generiert werden kann (Gruvberger et al., 2001; West et al., 2001).

Ein Nachteil dieser Methoden ist der Bedarf an großen Mengen RNA aus den zu untersuchenden Geweben bzw. die Notwendigkeit von Amplifikationssystemen zur Vermehrung der RNA-Moleküle.

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde ein bioinformatischer Ansatz als Methode der vergleichenden Expressionsanalyse zwischen dem Tumor und dem korrespondierenden Normalgewebe gewählt. Im Gegensatz zu den oben genannten, labortechnischen Methoden erfolgte die Suche nach neuen tumorassoziierten Genen durch die systematische Auswertung von cDNA-Bibliotheken. Die Gesamtheit der in diesen cDNA-Bibliotheken enthaltenen ESTs repräsentiert das Expressionsmuster des jeweiligen Gewebes, aus denen sie generiert wurden. Mittels der bioinformatischen Programme AUTEX und dem elektronischen Northern wurden die ESTs als exprimierte Teilsequenzen der Gene aus den cDNA-Bibliotheken assembliert und nach der in-silico Expressionsanalyse aufgrund ihrer differentiellen Expression in den Tumoren selektiert (Schmitt et al., 1999). Der Nutzen von EST-Datenbanken zur Identifizierung tumorassoziierten Gene wurde in einer vergleichbaren Studie beschrieben. Dabei wurde ein Expressionsprofil durch den zum elektronischen Northern äquivalenten digitalen Differential Display für verschiedene solide Tumore erstellt (Scheurle et al., 2000).

Wichtige Grundlage für den elektronischen Northern war die korrekte Assemblierung der ESTs zu den entsprechenden Genen. Die erfolgreiche Generierung der Vollängentranskripte aus den ESTs über das Programm AUTEX konnte für zehn der 14 bearbeiteten Genen aus 1q und 11q durch den anschließenden Datenbankvergleich bzw. durch Nachsequenzierung und Northernblot-Analysen mittels genspezifischer cDNA-Klonen bestätigt werden. Im Falle sehr großer Transkripte wie bei den Genen FZD4 oder dem putativen Calpain wurde nur ein Teilabschnitt am 3'-Ende der gesamten transkribierten Sequenz durch spezifische ESTs abgedeckt. Das Fehlen der 5'-Enden von langen Transkripten erklärt sich aus dem Prinzip der Generierung der cDNA-Bibliotheken, das heißt der durchgeführten cDNA-Synthese mittels Oligo(d)T-Primer und anschließender Klonierung und Sequenzierung der cDNA-Fragmente (Krizman et al., 1996). Im Vergleich zur Transkriptgröße des Northernblots ergaben sich nach der Assemblierung der ESTs auch für die Gene DAP4 und CGI-85 kürzere cDNA-Sequenzen, die sich durch den entsprechenden Datenbankeintrag verifizieren ließen. Die Transkriptgröße des Gens DAP4 im Northernblot bestätigte sich in der Beschreibung des zu DAP4 synonymen Gens P52^{rIPK} (Gale et al., 1998), während für das Gen CGI-85 keine vergleichbaren Studien vorlagen. Weitere Arbeiten zeigen durch

ähnliche bioinformatische Ansätze den Erfolg der in-silico Klonierung von Vollängen-transkripten durch ESTs (Prigent et al., 1999; Huminiecki et al., 2000; Wittenberger et al., 2001).

Für die Expressionsanalyse der Gene in 23 unterschiedlichen Normalgeweben und korrespondierenden Tumoren durch den elektronischen Northern standen 4 Mio. ESTs aus den öffentlichen und privaten cDNA-Bibliotheken zur Verfügung. Ein Vergleich der Genexpression in den Normalgeweben zwischen den cDNA-Bibliotheken des in-silico Ansatzes und der Northernblot-Analyse ergab signifikante Korrelationen bei den untersuchten Genen. Am Beispiel des Gens YAP65 bestätigt sich die ubiquitäre Expression sowohl im elektronischen Northern als auch im Northernblot im Vergleich zur Literatur (Sudol et al., 1995). Dabei können Differenzen zwischen den beiden Methoden auf die geringe Anzahl der ESTs in den cDNA-Bibliotheken betreffender Gewebe zurückzuführen sein. Während der Northernblot die Expression eines Gens in einer relativ großen, konstanten Menge von RNA-Molekülen der untersuchten Gewebe wiedergibt, ist die Auflösung der Expressionsunterschiede im elektronischen Northern von der EST-Anzahl eines Gens in Bezug zur Bibliotheksgröße der Gewebe abhängig. Dies erklärt die deutlichere Übereinstimmung der Expressionsmuster bei spezifischen, stark exprimierten Genen wie dem putativen Calpain gegenüber den ubiquitär oder sehr schwach exprimierten Genen wie PPP2R5A.

Die Auswahl der differenziell exprimierten Gene beruhte in dieser Arbeit auf dem Vergleich zwischen den cDNA-Bibliotheken der Brust- bzw. Ovargewebe und den daraus entstehenden Tumoren. Um maximale Bibliotheksgrößen zwischen 30.000 und 120.000 ESTs zu erhalten, wurden die ESTs aus den einzelnen cDNA-Bibliotheken der jeweiligen Gewebe gepoolt. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss daher berücksichtigt werden, dass der elektronische Northern eines Gens nicht nur von dem unterschiedlichen Expressionsprofil zwischen verschiedenen Tumorpatienten beeinflusst wird sondern auch von möglichen Expressionsunterschieden in den verschiedenen Tumorsubtypen wie beispielweise dem lobulären und duktalem Karzinom der Brust (Ahr et al., 2001). Diese Aspekte der in-silico Expressionsanalyse von Kandidatengenen spiegeln sich bei der Validierung durch den cDNA-Array wieder. Im Unterschied zu den gepoolten cDNA-Bibliotheken von Geweben mehrerer Probanden als Grundlage des elektronischen Northern beziehen sich die visualisierten Expressionssignale des cDNA-Arrays auf das Gewebe von jeweils einem Probanden. Von den insgesamt 14 untersuchten Genen aus 1q und 11q wurde die differenzielle

Expression in Brusttumoren bei den Genen ELBT, FZD4 und dem putativen Calpain in mehr als 75% der untersuchten Tumorprobenpaare des cDNA-Arrays bestätigt. Für die Gene YAP65, DAP4 und PPP2R5A bestätigte sich die veränderte Expression in 30-50% der Tumorproben. Die Deregulation der Genexpression in vergleichbaren Anteilen der Brusttumore wurde schon für beschriebene tumorassoziierte Gene wie ERBB2 gezeigt (Perou et al., 2000). Sechs der 14 Gene ließen sich über den cDNA-Array nicht bestätigen, für die zwei Gene SIP und CGI-85 war aufgrund fehlender Expressionssignale keine Auswertung möglich. Die Repräsentativität der neun Brusttumor-Probenpaare zeigt sich durch nachfolgende Expressionsexperimente mit größerem Probenumfang am Beispiel der Gene ELBT und PPP2R5A. Die drei Ovartumor-Probenpaaren des cDNA-Arrays können nur begrenzt als Bestätigung des elektronischen Northern genutzt werden und machen umfassendere Expressionsstudien bei dieser Tumorentität notwendig.

Resümierend konnte bei der Hälfte der auswertbaren Gene die im elektronischen Northern vorhergesagte differenzielle Expression für eine signifikante Fraktion der untersuchten Tumore im cDNA-Array bestätigt werden. Dieser bioinformatische Ansatz zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene hat sich damit als nützliches Vorscreening erwiesen, der durch die größer werdende Zahl von cDNA-Bibliotheken weiter an Effektivität gewinnen könnte. Ein weiteres Ziel sollte es sein, die EST-Datenbanken in die verschiedenen Subtypen der Tumore zu unterteilen, um Fragestellungen der Tumorentität und der Tumorprogression mit den differenziell exprimierten Genen zu korrelieren. Die Ergebnisse unterstreichen aber auch die Wichtigkeit der Validierung dieser in-silico Expressionsanalyse, um die Kandidatengene zu selektieren, deren veränderte Genexpression verifizierbar sind und weitere aufwendigere Methoden rechtfertigen.

D.2 Bewertung der Kandidatengene in 11q12-q23 unter Einbeziehung der positionalen in-silico Expressionsanalyse

Die zahlreich beschriebenen Aberrationen im langen Arm von Chromosom 11 für Brust- und Ovarialtumore weisen auf die Lokalisation von tumorassoziierten Genen hin. Korrelationen zwischen Veränderungen der Gene auf DNA-Ebene und der Genexpression haben sich bereits für die chromosomale Region 11q bestätigt. In der amplifizierten Region 11q13 wurden mit Cyclin D1 und EMS1 Gene beschrieben, die in einer Fraktion von Brusttumoren überexprimiert sind und ein tumorförderndes Potenzial

besitzen (Karleder et al., 1994; Schuurin, 1995). In weiteren aberranten Genloci wie den LOH-Regionen in 11q14.1-q23.3 werden noch unbekannte tumorassoziierte Gene vermutet (Negrini et al., 1995; Laake et al., 1997). Nach der genomweiten in-silico Expressionsanalyse wurden neun Kandidatengene in die Region 11q12-q23 kartiert. Diese Gene waren nach dem elektronischen Northern in Brusttumoren geringer exprimiert (ELBT, FZD4, MS4A6A, YAP65 und DAP4) oder in Brust- und Ovarialtumoren überexprimiert (CGI-85, CLNS1A, FAU und SIP). Sie stellen damit potenzielle Kandidatengene für die aberranten Regionen in 11q dar und könnten in die Tumorentstehung und -progression involviert sein. Nach der Validierung des elektronischen Northern bestätigte sich für die Gene ELBT, FZD4, YAP65 und DAP4 die Herunterregulation der Expression in einer Fraktion der untersuchten Brusttumore, während die übrigen Gene keine signifikante Expressionsunterschiede in den Tumoren zeigten.

Die große Zahl beschriebener LOH-Marker und amplifizierter Gene in 11q bei Brusttumoren sowie die fortschreitende Annotation der humanen genomischen Sequenz ermöglichten es, eine weitere positionsspezifische in-silico Expressionsanalyse für möglichst viele Transkripte in diesem chromosomalen Abschnitt durchzuführen. Eine Studie mit einer ähnlich systematischen Suche nach differenziell exprimierten Genen beschreibt neue Kandidatengene in der aberranten Region 17q23 (Monni et al., 2001). Neben den oben genannten, bereits validierten Genen aus 11q12-q23 konnten über den Ansatz weitere 23 Kandidatengene für Brusttumore in dieser chromosomalen Region identifiziert werden.

In den folgenden Abschnitten werden die experimentellen Expressionsdaten der neun Kandidatengene im Vergleich zu beschriebenen Funktionen diskutiert. Die Gegenüberstellung dieser Gene mit den aberranten Loci in 11q12-q23 des positionsspezifischen Ansatzes gab Aufschluss über die Korrelation der veränderten Genexpression mit genomischen Veränderungen.

Das Gen FZD4 ("Frizzled-4") kodiert für einen 7-Transmembran-Rezeptor und gehört der FZD-Genfamilie an (Kirikoshi et al., 1999). Diese Rezeptoren binden die Glykoproteine WNT innerhalb des "Wingless-Signaltransduktionsweges", der die Aktivität von β -Catenin und dadurch die Transkription von wachstumsfördernden Genen reguliert. Eine positive Regulation dieses Signaltransduktionsweges wurde neben anderen Mitgliedern dieser Rezeptoren für eine Spleißvariante von FZD4 beschrieben (Sagara et al., 2001). Im Falle einer ähnlichen Funktion von FZD4 würde nach

bisherigen Erkenntnissen ein vermehrt auftretender Rezeptor eine Proliferationsstimulation verursachen und für eine tumorfördernde Wirkung sprechen. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Erstbeschreibung des Gens die mögliche Funktion von FZD4 als Tumorsuppressorgen. Es konnten für eine mutierte Form von FZD4, jedoch nicht für das Wildtypgen FZD4, stabile Transformanten etabliert werden, die das Gen in Tumorzellen überexprimieren (Kirikoshi et al., 1999). Eine mögliche Erklärung wäre die Hemmung des Wachstums der Tumorzellen durch die Überexpression von Wildtyp-FZD4 und würde für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten verringerten Expression von FZD4 in Tumoren sprechen. Eine weitere Assoziation von FZD4 als mögliches Tumorsuppressorgen in Brusttumoren ergab sich nach der physikalischen Kartierung. In der Nähe des Genlocus von FZD4 ist eine LOH-Region lokalisiert, deren Marker D11S4175, D11S1342, D11S873 und D11S29 in etwa 38% der untersuchten Brusttumore deletiert sind (Negrini et al., 1995; Schmutzler et al., 1996; Koreth et al., 1997; Shen et al., 2000). Die Ergebnisse der genomischen und transkriptionellen Analysen sprechen für eine tumorsupprimierende Eigenschaft des Gens FZD4, die durch eine funktionelle Charakterisierung des translatierten Rezeptors im Brustepithel bewiesen werden muss.

Das Gen YAP65 ("Yes-associated protein") kodiert für ein 65kDa Protein mit einer prolinreichen Bindungsdomäne und einer konservierten WW-Domäne (Sudol et al., 1994; Chen et al., 1995). Bislang beschriebene Experimente weisen darauf hin, dass YAP65 als Transkriptions-Coaktivator wirkt, der über die prolinreiche Region an die SH3-Domäne von Tyrosin-Kinasen wie den Protoonkogen-Produkten c-Yes, c-Src oder Crk bindet und deren Signal vom Cytoplasma in den Zellkern auf Transkriptionsfaktoren überträgt (Sudol et al., 1995; Yagi et al., 1999). Die WW-Domäne der Proteinsequenz von YAP65 ist für die Bindung an Transkriptionsfaktoren wie PEBP2 α A verantwortlich. Zielgene, deren Transkription durch YAP65 beeinflusst sein könnten, sind noch unbekannt. Eine Assoziation zur Tumorenstehung ergibt sich aufgrund der beobachteten Überexpression von Tyrosin-Kinasen in Brusttumoren und des möglichen Therapieansatzes durch Inhibitoren (Moasser et al., 1999). Dabei ist unklar, ob Expressionsveränderungen des Gens YAP65 die Vermittlung des tumorfördernden Signals beeinflussen. Als weitere interessante Beobachtung ist die Interaktion von YAP65 mit dem p53-Bindungsprotein 2 (53BP2) beschrieben worden (Linn et al., 1997; Espanel et al., 2001). Das Protein 53BP2 verstärkt die Aktivität des bekannten Tumorsuppressors p53, hemmt den Zellzyklus und aktiviert die Apoptose (Naumovski et

al., 1996; Lopez et al., 2000). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Herunterregulation der Genexpression von YAP65 in Brusttumoren weist auf die mögliche Funktion eines Tumorsuppressorgens hin. Dieser Einfluss von YAP65 könnte sich im Falle eines negativen Einfluss auf die Signalübertragung der Src-Protoonkogen-Produkte oder im Zusammenhang mit der Interaktion zu 53BP2 durch eine positive Regulation auf die wachstumshemmende Funktion des Proteins ausprägen. Ein weiterer Hinweis auf YAP65 als Tumorsuppressorgen-Kandidat zeigt sich in dieser Arbeit durch den Vergleich mit LOH-Studien in Brusttumoren. Für die im Abstand von ca. 1Mb zum Gen YAP65 gelegenen Marker D11S35 und D11S940 sind in etwa 39% der untersuchten Brusttumore Deletionen beschrieben worden (Gudmundsson et al., 1995; Negrini et al., 1995). YAP65 stellt aufgrund der verringerten Expression und der beschriebenen funktionellen Aspekte ein mögliches Kandidatengen für diese LOH-Region in 11q22.1 dar.

Als weiteres in dieser Arbeit identifiziertes Gen zeigte DAP4 ("Death associated protein") eine verringerte Expression in Brusttumoren. Das Gen wurde unter der synonymen Bezeichnung P52^{rIPK} beschrieben und kodiert für ein Inhibitorprotein des PKR-Repressors P58^{IPK} (Gale et al., 1998). Die interferon-induzierte Serin/Threonin-Proteinkinase (PKR) wird durch virale Invasion, Cytokine, Wachstumsfaktoren sowie weitere Stressfaktoren aktiviert und hemmt durch die Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 die Proteintranslation in der Zelle (Williams, 1999). Aufgrund der Hemmung der Proliferation und Aktivierung der Apoptose wurde PKR als mögliches Tumorsuppressorgen beschrieben. (Jagus et al., 1999; Savinova et al., 1999). Dem Repressor P58^{IPK} wird aufgrund der Hemmung der Proteinkinase PKR ein tumorförderndes Potential zugeschrieben (Lee et al., 1994; Barber et al., 1994). Das Protein P52^{rIPK} wirkt durch die Hemmung des P58-Repressors als positiver Regulator von PKR in dieser Signalkaskade und könnte daher wie PKR als potenzielles Tumorsuppressorgen fungieren (Gale et al., 1998). Diese Hypothese würde die in dieser Arbeit beobachtete verringerte Expression von P52^{rIPK} (DAP4) in Brusttumoren erklären.

Die Gene CLNS1A, FAU und SIP stellen nach dem elektronischen Northern aufgrund der Überexpression tumorassoziierte Gene für Brust- und Ovarialtumore dar, wobei sich die differenzielle Expression in den Validierungsexperimenten nicht bestätigt hat. Das Gen CLNS1A und eine intronlose Kopie CLNS1B kodieren für den Chloridkanal ICln, der durch den Chloridtransport das Zellvolumen reguliert (Nagl et al., 1996; Schwartz et

al., 1997). Das Gen CLNS1A wurde aufgrund der nahen chromosomalen Lokalisation zu GARP als ein mögliches Kandidatengen in der amplifizierten Region 11q13-q14 für Brusttumore beschrieben (Karlseder et al., 1994; Bekri et al., 1997). Die bislang bekannte Funktion des Chloridkanals ICln ergab keine Assoziation zur Tumorentstehung. Das Gen FAU stellt ein zelluläres Homolog zur viralen Sequenz FOX dar, das für ein Fusionsprotein bestehend aus dem ribosomalen Protein S30 und einem Ubiquitin-ähnlichen Protein kodiert (Kas et al., 1992; 1993). Das Gen FAU zeigt wie das Gen SIP ("SYT interacting protein") bis auf die chromosomale Lokalisation in der amplifizierten Region 11q13 keinen Hinweis auf ein tumorförderendes Potenzial. Auch für die beiden in-silico Kandidatengene MS4A6A und CGI-85 ergaben sich aus den bisherigen Beschreibungen keine Assoziationen zur Tumorentstehung (Liang et al., 2001; Lai et al., 2000). Damit konnten die zuletzt aufgeführten in-silico Kandidatengene weder experimentell noch durch Literaturdaten bestätigt werden.

Neben den neun kartierten Genen aus der genomweiten Expressionsanalyse konnten durch die systematische Suche nach differenziell exprimierten Genen in 11q12-q23 weitere Kandidatengene für die Entstehung von Brusttumoren identifiziert werden. Der Vergleich mit den LOH- und Amplifikationsstudien ergibt eine Reihe von in-silico differenziell exprimierten Genen, die benachbart zu beschriebenen aberranten Regionen in 11q kartieren. Die Abfolge der Gene und Marker zeigen vermehrt überexprimierte Gene im proximalen Teil 11q12-q13. Ein Gencluster in 11q13.3-q13.4 grenzt an die häufig beschriebene amplifizierte Region mit Cyclin D1 und könnte potenzielle Onkogene für dieses Amplikon beinhalten. Für die dort lokalisierte Proteinkinase MLK3 wurde bereits im Falle der Überexpression in Fibroblasten eine transformierende Aktivität beschrieben (Hartkamp et al., 1999). Die weiter zentromer gelegene, signifikante Anhäufung überexprimierter Genen in 11q13.1 könnte auf eine größere Ausdehnung der schon beschriebenen amplifizierten Region 11q13 in Brusttumoren hinweisen. Unabhängige Amplifikationen von tumorassoziierten Genen innerhalb einer distinkten Region wurden bereits für EMS1 im 11q13 Amplikon beschrieben (Hui et al., 1997). Für die meisten der zentromer identifizierten Kandidatengene wurde die in-silico differenzielle Expression bislang nicht validiert bzw. ergaben sich keine entsprechenden Hinweise in der Literatur. Die Überexpression des im genomischen Ansatz untersuchten Gens FAU ließ sich durch den cDNA-Array nicht verifizieren. Im Gegensatz dazu bestätigte sich die beobachtete Überexpression von

MGB1 (Mammaglobin 1) in der Literatur (Watson et al., 1996). Die beiden Beispiele zeigen die Notwendigkeit der Validierung dieser neuen tumorassoziierten Gene.

Im Gegensatz zu den Amplikons in 11q13 wurden innerhalb der Region 11q14-q23 vermehrt Deletionen in Brusttumoren beschrieben (Gudmundsson et al., 1995; Negrini et al., 1995; Laake et al., 1997). Die bereits beschriebenen Gene FZD4 und YAP65 kartieren in zwei distinkte LOH-Regionen in 11q14 bzw. 11q22. Sie stellen zusammen mit den beiden noch nicht verifizierten Genen CLTH ("Clathrin assembly protein"; CALM) und MMP7 ("Matrix Metalloproteinase 7") potenzielle Kandidatengene für diese LOH-Regionen dar. Für das Protein MMP7 wurde mit der Hemmung der Vaskularisierung in Tumoren bereits eine Funktion beschrieben, die das Tumorstromwachstum beeinflusst (Pozzi et al., 2000).

Die über diesen positionalen Ansatz identifizierten Kandidatengene in 11q12-q23 bilden eine gute Grundlage, potenzielle Tumorsuppressorgene und Onkogene durch weitere Expressionsexperimente und funktionelle Analysen zu verifizieren. Darüber hinaus lässt sich der beschriebene Vergleich von differenziell exprimierten Genen mit aberranten DNA-Regionen auf weitere interessante chromosomale Regionen anwenden. Mit Hilfe des elektronischen Northern kann diese Vorselektion tumorassoziierten Gene neben Brust- und Ovarialtumoren auch auf andere Tumorentitäten fokussiert werden. Die Methode der in-silico Expressionsanalyse stellt nur eine Möglichkeit dar, Kandidatengene für die LOH- und Amplifikationsregionen zu selektieren. Für einige aberrante Loci, wie beispielsweise in der distalen LOH-Region 11q22-q23 ergaben sich in dieser Arbeit über den bioinformatischen Ansatz keine Kandidatengene. Ein Vergleich der chromosomalen Lokalisation von aberranten Loci mit putativen Genen aus der annotierten genomischen Datenbank könnte zusätzlich als Grundlage zur Identifizierung tumorassoziierten Gene dienen.

D.3 ELBT als potenzielles Tumorsuppressorgen im Brustepithel

Das Gen ELBT zeigte nach dem elektronischen Northern eine signifikant geringere Expression in Brusttumoren gegenüber den Normalgeweben. Diese Herunterregulation auf RNA-Ebene bestätigte sich sowohl in den cDNA-Array-Experimenten als auch in der quantitativen Expressionsanalyse mikrodissasierter Gewebe in über 50% der Tumorproben. Bis zum Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit ergab der Datenbankvergleich keine Homologien zu schon funktionell beschriebenen humanen Genen. Die durchgeführte Annotation der Proteinsequenz von ELBT weist darauf hin,

dass es sich um eine putative Acyltransferase handelt. Durch den Vergleich mit Proteinen aus anderen Spezies konnte eine konservierte Proteinfamilie mit 18 Mitgliedern zusammengestellt werden. Die Proteinfamilie zeichnet sich durch eine Transmembrandomäne aus und zeigt Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der 1-Acyl-SN-Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (1-AGPAT). Diese Enzyme katalysieren die Umwandlung von Lysophosphatidsäure (LPA) in Phosphatidsäure (PA). Es handelt sich dabei um zwei Phospholipide, die in die Lipidsynthese und in Signaltransduktionsprozesse involviert sind (Kume et al., 1997; Leung et al., 2001). Für die Isoform AGPAT2 wird aufgrund von Expressionsstudien ein Einfluss in die Karzinogenese des weiblichen Genitaltraktes vermutet. Eine Korrelation zur Tumorentstehung wurde auch für weitere Mitglieder der membranständigen O-Acyltransferasen beschrieben. Für die beiden Enzyme Acyl CoA:Glycerol Acyltransferase (ACAT) und Acyl CoA:Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) zeigen sich aufgrund von Sequenzhomologien zu charakterisierten Proteinen aus anderen Spezies mögliche Assoziationen zum schon genannten WNT-Signaltransduktionsweg (Hofmann, 2000). Das homologe Protein Porc ist essentiell für die Prozessierung und Sekretion des Gykloproteins WNT, das beim Menschen die Transkription von tumorfördernden Zielgenen wie Cyclin D1, c-Myc oder c-Jun über eine Signalkaskade aktiviert (Kadowaki et al., 1996; Dierick et al., 1999).

Nach den Expressionsanalysen in dieser Arbeit ergibt sich für ELBT die mögliche Funktion eines Tumorsuppressors in den Epithelien der Brust. In diesem Zusammenhang könnte die Funktion von zwei weiteren Enzymen dieser Gruppe, der Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) und der Acyl CoA:Retinol Acyltransferase (ARAT) Aufschluss über eine Involvierung in die Karzinogenese geben. Diese Enzyme katalysieren die Umwandlung von Retinol in Retinylester, die bereits als chemopräventive und chemotherapeutische Agenzien bei Brusttumorkranken eingesetzt werden (Guo et al., 2000; Yang et al., 1999). Retinol-Metabolite regulieren Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in normalen und malignen Epithelzellen (Gudas et al., 1994). Für das Gen LRAT wurde eine reduzierte Expression in transformierten epithelialen Zellen der Brust beschrieben. Ein Hinweis für eine funktionelle Homologie mit den genannten Enzymen LRAT und ARAT beziehungsweise der Umsetzung von Retinol ergibt sich aus dem Expressionsmuster des Gens ELBT in der Haut. ELBT zeigt eine sehr spezifische Expression in den oberen Hautschichten *Stratum granulosum* und *Stratum lucidum* an der Grenze zur *Stratum corneum*. Diese Hautschichten zeichnen sich neben einer geringer werdenden Proliferationsaktivität und

steigender Differenzierung der Keratinozyten auch durch die größte Konzentration an Retinylester wie Vitamin A aus (Torma, 1990). Vergleichbar zum Enzym ARAT könnte eine erhöhte Aktivität von ELBT in den oberen Hautschichten die steigenden Konzentrationen von Retinylestern mit verursachen. Aufgrund der spezifischen Expression von ELBT wäre ein Einfluss dieser Acyltransferase zusammen mit den bereits beschriebenen Enzymen LRAT und ARAT in den Retinol-Metabolismus möglich. Im malignen Brustepithel könnte die analysierte, verringerte Expression von ELBT zu einer mangelnden Umsetzung von Retinol beitragen und dadurch die Transformation der Epithelzellen begünstigen.

Zwei aktuelle Referenzen beschreiben eine neue Acyl CoA:Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT2), die identisch mit dem in dieser Arbeit benannten ELBT-Protein ist (Lardizabal et al., 2001; Cases et al., 2001). Das aufgeführte Expressionsmuster von DGAT2 in Leber, Brust, Hoden und den peripheren Blutleukozyten bestätigt die Identität mit dem Gen ELBT, wobei die beschriebene kleinere Spleißvariante mit 1,4kb in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert wurde. Dies ist auf eine unterschiedliche Sondenauswahl für den Northernblot zurückzuführen. Das Protein DGAT2 zeigt keine signifikante Homologie zum bereits beschriebenen humanen DGAT. Es wurden jedoch Ähnlichkeiten zu weiteren Proteinen anderer Spezies festgestellt, die auch in dieser Arbeit identifiziert wurden. Die Klassifizierung als DGAT2 begründet sich in der Literatur auf die Homologie zu DGAT aus dem Pilz *Mortierella Ramanniana* (Lardizabal et al., 2001). Die Verwandtschaft zu DGAT ist funktionell durch die Expression von DGAT2 in Insektenzellen bestätigt worden, die eine Stimulierung der Triglycerin-Synthese in Abhängigkeit vom Vorhandensein der Fettsäure Acyl CoA und Diacylglycerin ergaben (Cases et al., 2001). Aufgrund der beschriebenen Funktion in der Lipidsynthese wird DGAT2 neben DGAT als ein neues Kandidatengen für Adiposis diskutiert. Diese neuen Literaturdaten deuten darauf hin, dass die großen Expressionsunterschiede des Gens DGAT2 in Brusttumoren gegenüber dem Normalgewebe im cDNA-Array auf unterschiedliche Bestandteile an Fettgewebe zurückzuführen sein könnten. Dagegen spricht die Bestätigung der differentiellen Expression in den cDNA-Arrays durch die quantitative PCR-Analyse der mikrodissezierten Gewebeproben, in denen überwiegend epitheliales Gewebe selektiert wurde. Die Expression von DGAT2 in benignen Brustepithelzellen bestätigt sich zudem in den Experimenten der RNA in-situ Hybridisierung.

Die bisherigen funktionellen Beschreibungen von DGAT2 schließen die diskutierten Assoziationen zu anderen Acyltransferasen nicht aus. Hinweise, dass es sich bei diesen Proteinen um multifunktionelle Enzyme handeln könnte, zeigten sich bereits für zahlreiche membranständige Acyltransferasen und wurde auch bei DGAT vermutet (Hofmann, 2000). Die Mutationsanalyse der acht Exons dieses Gens erbrachte keinen Hinweis auf Mutationen in der genomischen Sequenz der untersuchten Brusttumore, die auf eine Veränderung oder den Ausfall des Proteins hindeuten könnten. Weitere, zu überprüfende Möglichkeiten der Inaktivierung der Transkription wären Mutationen im Promotorbereich oder Hypermethylierung der DNA-Sequenz, die mittlerweile als häufigere Mechanismen des Verlustes von Tumorsuppressorgen-Funktionen angenommen werden (Ponder et al., 2001). Der Nachweis der Proteinexpression von DGAT2 im Epithelgewebe der Brust und eine weitere funktionelle Analyse des Enzyms sind nötig, um Aufschluss über eine mögliche Involvement in die Karzinogenese zu erhalten.

D.4 Bewertung der Kandidatengene in 1q32-q41

Die chromosomale Region 1q32-q41 wurde in zahlreichen CGH-Studien mit Brust- und Ovarialkarzinomen als amplifiziert beschrieben (Tirkkonen et al., 1998, Sonoda et al., 1997). Diese DNA-Veränderungen lassen auf eine Überexpression möglicher tumorfördernder Gene in 1q schließen, die einen Einfluss auf die Tumorentstehung haben könnten. Mit MDM4 und ELF3 sind bereits zwei Kandidatengene aus 1q32 bekannt, die als überexprimiert in verschiedenen Tumoren beschrieben wurden (Tymms et al., 1997; Riemenschneider et al., 1999). Nach dem Ergebnis der in-silico Expressionsanalyse in der vorliegenden Arbeit zeigen die in 1q kartierten Gene ELF3, PPP2R5A, HSPC186 und das putative Calpain eine Überexpression in Brust- oder Ovarialtumoren. Damit korreliert das Expressionsverhalten der identifizierten Gene mit den beschriebenen Aberrationen auf DNA-Ebene, die auf die Lokalisation von potenziellen Onkogenen in dieser Region hindeuten. Nach der Validierung des elektronischen Northern bestätigte sich die differenzielle Expression in Brusttumoren für das putative Calpain und in einer kleineren Fraktion der Tumore bei dem Gen PPP2R5A. Die Diskussion der fünf Kandidatengene mit den in der Literatur beschriebenen Funktionen gibt im folgenden weiteren Aufschluss über eine mögliche Tumorassoziation.

Das Gen für den "Decay-accelerating Factor" DAF (CD55) zeigte sich in der Mehrzahl der Ovarialtumorproben des cDNA-Arrays überexprimiert, wobei eine statistische Aussage die Untersuchung weiterer Tumore erfordert. Eine Überexpression von DAF wurde bereits in Tumorgewebe der Brust und des Dickdarms nachgewiesen (Thorsteinsson et al., 1998). Die beschriebene Funktion von DAF stützt die These eines tumorassoziierten Gens. Das membrangebundene Glykoprotein DAF inhibiert das Komplementsystem und könnte im Falle einer Überexpression die Tumorzellen vor einem Angriff durch das Immunsystem schützen. Für das Gen HSPC186 liegen keine Literaturdaten vor, beziehungsweise konnte keine Funktion des Proteins abgeleitet werden. Die Expressionsstudien zum Gen HSPC in Brusttumoren sprechen gegen eine Involvierung in die Karzinogenese.

Das Gen ELF3 kodiert für einen Transkriptionsfaktor der ETS-Familie und reguliert die Expression von Genen wie Keratin 4, der als Differenzierungsmarker bekannt ist (Oettgen et al., 1999; Brembeck et al., 2000). Als Kandidatengen für das Amplikon 1q32 ist ELF3 bereits in Lungen- und Adenokarzinomen als überexprimiert beschrieben worden (Tymms et al., 1997). Die in-silico Expressionsanalyse ergab eine Überexpression in Brusttumoren, die jedoch in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden konnte. Eine Involvierung des epithelial exprimierten Gens ELF3 in die Entstehung von epithelialen Tumoren ist aufgrund der beschriebenen Funktionen möglich, wobei die Expressionsstudie in dieser Arbeit keinen Hinweis auf den Einfluss in die Karzinogenese der Brust gibt.

Die assemblierte Sequenz des putativen Calpains zeigt Ähnlichkeiten zu einem gewebespezifischen Calpain der Ratte. Calpaine sind Ca^{2+} -abhängige Cysteinproteasen, die Moleküle wie Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und Cytoskelettproteine modifizieren (Sorimachi et al., 1997). Neben ubiquitär exprimierten Mitgliedern der μ - und m-Calpainen werden die gewebespezifischen Calpaine nCL-1, nCL-2 und nCL-4, die im Muskel, Magen beziehungsweise im Verdauungstrakt vorkommen, zu einer Familie zusammengefaßt. Die spezifische Genexpression des in dieser Arbeit identifizierten putativen Calpains im Dickdarm spricht dafür, dass es sich um ein weiteres Mitglied der gewebespezifischen Calpaine handelt. Die benachbarte Lokalisation des Calpains nCL-4 in 1q42 könnte auf ein Gencluster von Calpainen in dieser chromosomalen Region hindeuten (Lee et al., 1998). Im Vergleich zu den anderen gewebespezifischen Calpainen zeichnet sich das putative Calpain durch ein sehr großes Transkript von über 7kb aus. Um weitere Aussagen über

Sequenzhomologien treffen zu können, muß zunächst die identifizierte Teilsequenz des Gens vervollständigt werden. Unter der Annahme, dass die Expression des Gens normalerweise auf den Verdauungstrakt beschränkt ist, könnte die Überexpression in Brusttumoren auf eine Aktivierung der Transkription während der Tumorentstehung zurückzuführen sein. Für das Calpain nCL-4 wurde bereits eine Involvierung in die Entstehung des Magenkarzinoms vermutet (Yoshikawa et al., 2000). Eine mögliche tumorfördernde Wirkung von Calpainen zeigt die proteolytische Aktivität hinsichtlich Caspasen. Durch die Inaktivierung der Caspasen könnten Calpaine als negative Regulatoren der Apoptose agieren und damit die Tumorphiliferation begünstigen (Chua et al., 2000). Das putative Calpain ist aufgrund der Expressionsexperimente und den beschriebenen Funktionen möglicherweise in die Entstehung und Progression von Brusttumoren involviert, wobei die Entschlüsselung des Gens und des kodierenden Proteins als Grundlage für weitere Untersuchungen notwendig ist.

Das Gen PPP2R5A, kodierend für die regulatorische Untereinheit B56 alpha der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) wurde aufgrund der Überexpression in Brusttumoren identifiziert. Diese Serin/Threonin-Phosphatase besteht aus einer katalytischen, einer strukturellen und einer variablen regulatorischen Untereinheit von denen das Mitglied B56 alpha in 1q41 kodiert ist (McCright et al., 1996). Die katalytische Aktivität dieser Enzyme umfaßt posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung und Methylierung, die in wichtigen regulatorischen Prozessen wie Zellteilung, Zellmorphologie, Differenzierung, Apoptose und Transformation eine Rolle spielen (Janssens et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass PP2A über die regulatorische Untereinheit B56 den WNT-Signaltransduktionsweg inhibiert und dadurch einen potenziellen Tumorsuppressor darstellt (Li et al., 2001; Seeling et al., 1999). In Bezug auf die Karzinogenese der Brust hemmt PP2A aufgrund der Inhibition der Telomeraseaktivität ein unkontrolliertes Zellwachstum (Li et al., 1997). In Brustkarzinomen wie auch anderen Tumoren wurden sowohl in der katalytischen als auch in regulatorischen Untereinheiten Mutationen beschrieben, die wiederum für die Funktion eines Tumorsuppressorgens sprechen (Ruediger et al., 2001; Calin et al., 2000; Wang et al., 1998). Die beschriebenen Funktionen zur Protein-Phosphatase PP2A und zu den regulatorischen Untereinheiten sprechen gegen die Ausgangshypothese einer möglichen tumorfördernden Wirkung des Gens PPP2R5A. Für die translatierte regulatorische Untereinheit B56 alpha wurde jedoch bislang keine direkte Tumorassoziation gezeigt. Die heterogene Genexpression von PPP2R5A des cDNA-

Arrays und nach der quantitativen PCR von mikrodyssezierten Brusttumoren erschwert eine Aussage über die Involvierung von PPP2R5A in Brusttumoren. Sowohl die Überexpression als auch die geringere Expression von PPP2R5A in Brusttumoren deuten auf eine Deregulation der Transkription bei der Tumorgenese hin. Inwieweit die veränderte Genexpression von PPP2R5A einen Einfluss auf die Karzinogenese in der Brust ausübt, müssen funktionelle Analysen in diesen Geweben zeigen.

E Zusammenfassung

Brust- und Ovarialkarzinome gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen bei der Frau. Die Progression von benignen Neoplasien zu malignen Karzinomen werden von spezifischen Veränderungen des Genexpressionsmusters begleitet. Die Analyse der differentiellen Genexpression stellt eine Möglichkeit dar, neue tumorassoziierte Gene zu identifizieren und zur Aufklärung der molekularen Mechanismen in der Karzinogenese beizutragen.

Grundlage dieser Arbeit war ein bioinformatischer Ansatz, um differentiell exprimierte Gene für Brust- und Ovarialkarzinome zu selektieren. Durch die Auswertung von vier Millionen ESTs aus öffentlichen und privaten cDNA-Bibliotheken von Normalgeweben und der korrespondierenden Tumore wurde ein in-silico Expressionsmuster für putative Gene generiert. Nach der chromosomalen Kartierung erfolgte für weitere Analysen die Auswahl von 14 Genen aus den chromosomalen Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23, die häufig in Brust- und Ovarialkarzinomen als aberrant beschrieben wurden. Bei der Validierung der in-silico Expressionsdaten über Northernblot- und cDNA-Array-Analysen konnte die differentielle Expression in Brusttumoren für sechs Gene bestätigt werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung eines bislang unbekannten, potenziellen Tumorsuppressorgens ELBT in 11q13.5. Für dieses Gen wurde ein umfassendes Expressionsprofil mit Hilfe quantitativer RT-PCR (Taqman) von verschiedenen Geweben und Zelllinien, cDNA-Array-Analysen sowie RNA in-situ Hybridisierung erstellt. ELBT zeigt ein gewebespezifisches Expressionsmuster in Leber, Brust, Hoden, Blutleukozyten und Haut. Die verringerte Genexpression von ELBT konnte in über 50% der untersuchten Brusttumore sowohl auf dem cDNA-Array als auch bei mikrodissezierten Gewebeproben nachgewiesen werden. Eine Mutationsanalyse des Gens ELBT in 71 Brusttumoren ergab keinen Hinweis auf genomische Veränderungen. Die Proteinannotation führte zur Identifizierung einer neuen Familie putativer Acyltransferasen. Dies wurde in einer aktuellen Referenz bestätigt, die ELBT als Enzym Acyl CoA:Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT2) beschreibt, die für die Triglycerin-Synthese mitverantwortlich sein soll. Die spezifische Genexpression der Acyltransferase in der oberen Epidermis, in der ein erhöhter Retinol-Metabolismus stattfindet, könnte auf einen möglichen Mechanismus der Inhibierung der Karzinogenese im Brustepithel hindeuten.

Aufgrund der Vielzahl beschriebener aberranter Genloci in Brusttumoren erfolgte eine positional durchgeführte in-silico Expressionsanalyse für die Region 11q12-q23. Neben der Identifizierung von neuen Kandidatengenen führte dies zur Eingrenzung bereits validierter Gene für aberrante Genloci in dieser Region, die mit Hilfe der annotierten genomischen Sequenzdatenbank feinkartiert wurden. Die Gene des 7-Transmembran-Rezeptors FZD4, der die Aktivität von β -Catenin reguliert, und des Transkriptions-Coaktivators YAP65 zeigten sich in Brusttumoren herunterreguliert und stellen potenzielle Kandidatengene für LOH-Regionen in 11q14 und 11q22 dar.

In der chromosomalen Region 1q32 wurden ein spezifisch im Verdauungstrakt exprimiertes Gen mit Homologien zu einem Calpain der Ratte und das Gen PPP2R5A einer regulatorischen Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A als potenziell tumor-assoziierte Gene für die Karzinogenese der Brust identifiziert.

F Referenzen

- Adnane, J., P. Gaudray, M.P. Simon, J. Simony-Lafontaine, P. Jeanteur, and C. Theillet. 1989. Proto-oncogene amplification and human breast tumor phenotype. *Oncogene*. 4:1389-95.
- Ahr, A., U. Holtrich, C. Solbach, A. Scharl, K. Strebhardt, T. Karn, and M. Kaufmann. 2001. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol*. 195:312-20.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-10.
- Arnold, N., L. Hagele, L. Walz, W. Schempp, J. Pfisterer, T. Bauknecht, and M. Kiechle. 1996. Overrepresentation of 3q and 8q material and loss of 18q material are recurrent findings in advanced human ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 16:46-54.
- Aubele, M., A. Mattis, H. Zitzelsberger, A. Walch, M. Kremer, P. Hutzler, H. Hofler, and M. Werner. 1999. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 110:94-102.
- Aunoble, B., R. Sanches, E. Didier, and Y.J. Bignon. 2000. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol*. 16:567-76.
- Aust, G., W. Eichler, S. Laue, I. Lehmann, N.E. Heldin, O. Lotz, W.A. Scherbaum, H. Dralle, and C. Hoang-Vu. 1997. CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas. *Cancer Res*. 57:1798-806.
- Bakkenist, C.J., J. Koreth, C.S. Williams, N.C. Hunt, and J.O. McGee. 1999. Heat shock cognate 70 mutations in sporadic breast carcinoma. *Cancer Res*. 59:4219-21.
- Barbareschi, M., P. Pelosio, O. Caffo, F. Buttitta, S. Pellegrini, R. Barbazza, P. Dalla Palma, G. Bevilacqua, and A. Marchetti. 1997. Cyclin-D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21WAF1 immunohistochemical expression. *Int J Cancer*. 74:171-4.
- Barber, G.N., S. Thompson, T.G. Lee, T. Strom, R. Jagus, A. Darveau, and M.G. Katze. 1994. The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:4278-82.
- Barbieri, F., M. Cagnoli, N. Ragni, F. Pedulla, G. Foglia, and A. Alama. 1997. Expression of cyclin D1 correlates with malignancy in human ovarian tumours. *Br J Cancer*. 75:1263-8.
- Bekri, S., J. Adelaide, S. Merscher, J. Grosgeorge, F. Caroli-Bosc, D. Perucca-Lostanlen, P.M. Kelley, M.J. Pebusque, C. Theillet, D. Birnbaum, and P. Gaudray. 1997. Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet*. 79:125-31.
- Bellacosa, A., D. de Feo, A.K. Godwin, D.W. Bell, J.Q. Cheng, D.A. Altomare, M. Wan, L. Dubeau, G. Scambia, V. Masciullo, and et al. 1995. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer*. 64:280-5.

- Benitez, J., A. Osorio, A. Barroso, E. Arranz, M.A. Diaz-Guillen, M. Robledo, S. Rodriguez de Cordoba, and D. Heine-Suner. 1997. A region of allelic imbalance in 1q31-32 in primary breast cancer coincides with a recombination hot spot. *Cancer Res.* 57:4217-20.
- Berns, E.M., J.G. Klijn, I.L. van Staveren, H. Portengen, E. Noordegraaf, and J.A. Foekens. 1992. Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. *Eur J Cancer.* 28:697-700.
- Bertioli, D. 1997. Rapid amplification of cDNA ends. *Methods Mol Biol.* 67:233-8.
- Berx, G., K.F. Becker, H. Hofler, and F. van Roy. 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat.* 12:226-37.
- Bieche, I., B. Franc, D. Vidaud, M. Vidaud, and R. Lidereau. 2001. Analyses of MYC, ERBB2, and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction. *Thyroid.* 11:147-52.
- Bieche, I., A. Khodja, K. Driouch, and R. Lidereau. 1997. Genetic alteration mapping on chromosome 7 in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 3:1009-16.
- Bieche, I., A. Khodja, and R. Lidereau. 1999. Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 24:255-63.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Bishop, J.M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell.* 64:235-48.
- Blackwood, M.A., and B.L. Weber. 1998. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol.* 16:1969-77.
- Bonfield, J.K., K. Smith, and R. Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23:4992-9.
- Borg, A., H. Sigurdsson, G.M. Clark, M. Ferno, S.A. Fuqua, H. Olsson, D. Killander, and W.L. McGurie. 1991. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *Br J Cancer.* 63:136-42.
- Bose, S., S.I. Wang, M.B. Terry, H. Hibshoosh, and R. Parsons. 1998. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene.* 17:123-7.
- Brembeck, F.H., O.G. Opitz, T.A. Libermann, and A.K. Rustgi. 2000. Dual function of the epithelial specific ets transcription factor, ELF3, in modulating differentiation. *Oncogene.* 19:1941-9.
- Brett, D., S. Whitehouse, P. Antonson, J. Shipley, C. Cooper, and G. Goodwin. 1997. The SYT protein involved in the t(X;18) synovial sarcoma translocation is a transcriptional activator localised in nuclear bodies. *Hum Mol Genet.* 6:1559-64.
- Bryan, E.J., R.H. Watson, M. Davis, A. Hitchcock, W.D. Foulkes, and I.G. Campbell. 1996. Localization of an ovarian cancer tumor suppressor gene to a 0.5-cM region between D22S284 and CYP2D, on chromosome 22q. *Cancer Res.* 56:719-21.

- Buerger, H., R. Simon, K.L. Schafer, R. Diallo, R. Littmann, C. Poremba, P.J. van Diest, B. Dockhorn-Dworniczak, and W. Bocker. 2000. Genetic relation of lobular carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ, and associated invasive carcinoma of the breast. *Mol Pathol.* 53:118-21.
- Bueso-Ramos, C.E., T. Manshouri, M.A. Haidar, Y. Yang, P. McCown, N. Ordonez, A. Glassman, N. Sneige, and M. Albitar. 1996. Abnormal expression of MDM-2 in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 37:179-88.
- Burger, A.M., X. Zhang, H. Li, J.L. Ostrowski, B. Beatty, M. Venanzoni, T. Papas, and A. Seth. 1998. Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene.* 16:2459-67.
- Buyse, G., C. de Greef, L. Raeymaekers, G. Droogmans, B. Nilius, and J. Eggermont. 1996. The ubiquitously expressed p1Cln protein forms homomeric complexes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 218:822-7.
- Calin, G.A., M.G. di lasio, E. Caprini, I. Vorechovsky, P.G. Natali, G. Sozzi, C.M. Croce, G. Barbanti-Brodano, G. Russo, and M. Negrini. 2000. Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene.* 19:1191-5.
- Campbell, I.G., W.D. Foulkes, G. Beynon, M. Davis, and P. Englefield. 1995. LOH and mutation analysis of CDKN2 in primary human ovarian cancers. *Int J Cancer.* 63:222-5.
- Carter, S.L., M. Negrini, R. Baffa, D.R. Gillum, A.L. Rosenberg, G.F. Schwartz, and C.M. Croce. 1994. Loss of heterozygosity at 11q22-q23 in breast cancer. *Cancer Res.* 54:6270-4.
- Cases, S., S. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K.D. Lardizabal, T. Voelker, and R.V. Farese, Jr. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem.* 31:31.
- Champeme, M.H., I. Bieche, S. Lizard, and R. Lidereau. 1995. 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 12:128-33.
- Chang, J., C. Lee, K.B. Hahm, Y. Yi, S.G. Choi, and S.J. Kim. 2000. Over-expression of ERT(ESX/ESE-1/ELF3), an ets-related transcription factor, induces endogenous TGF-beta type II receptor expression and restores the TGF-beta signaling pathway in Hs578t human breast cancer cells. *Oncogene.* 19:151-4.
- Chen, H.I., and M. Sudol. 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7819-23.
- Chen, T., A. Sahin, and C.M. Aldaz. 1996. Deletion map of chromosome 16q in ductal carcinoma in situ of the breast: refining a putative tumor suppressor gene region. *Cancer Res.* 56:5605-9.
- Chenchik, A., L. Diachenko, F. Moqadam, V. Tarabykin, S. Lukyanov, and P.D. Siebert. 1996. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques.* 21:526-34.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.

- Chua, B.T., K. Guo, and P. Li. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem.* 275:5131-5.
- Clark, J.M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16:9677-86.
- Cliby, W., S. Ritland, L. Hartmann, M. Dodson, K.C. Halling, G. Keeney, K.C. Podratz, and R.B. Jenkins. 1993. Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Res.* 53:2393-8.
- Colitti, C.V., K.J. Rodabaugh, W.R. Welch, R.S. Berkowitz, and S.C. Mok. 1998. A novel 4 cM minimal deletion unit on chromosome 6q25.1-q25.2 associated with high grade invasive epithelial ovarian carcinomas. *Oncogene.* 16:555-9.
- Cooper, G.M. *Oncogenes*, 2nd ed., Jones and Bartlett Publ, Sudbury, MA (1995).
- Courjal, F., M. Cuny, J. Simony-Lafontaine, G. Louason, P. Speiser, R. Zeillinger, C. Rodriguez, and C. Theillet. 1997. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res.* 57:4360-7.
- Cox, D.R., M. Burmeister, E.R. Price, S. Kim, and R.M. Myers. 1990. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science.* 250:245-50.
- Dahiya, R., and G. Deng. 1998. Molecular prognostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 52:185-200.
- Dahl, E., R. Kuner, P. Pilarsky, T. Specht, Schmitt A., Hinzmann B., and A. Rosenthal. 1999. Chromosomal assignment of more than 300 genes differentially expressed in human gynecological tumors. *J Mol Med.* 77:B1-15.
- Davis, M., A. Hitchcock, W.D. Foulkes, and I.G. Campbell. 1996. Refinement of two chromosome 11q regions of loss of heterozygosity in ovarian cancer. *Cancer Res.* 56:741-4.
- Deng, G., Y. Lu, G. Zlotnikov, A.D. Thor, and H.S. Smith. 1996. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science.* 274:2057-9.
- DeVita: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Copyright © 1997.
- Di lasio, M.G., G. Calin, M.G. Tibiletti, I. Vorechovsky, K.P. Benediktsson, R. Taramelli, G. Barbanti-Brodano, and M. Negrini. 1999. Refinement of the LOH region 1 at 11q23.1 deleted in human breast carcinomas and sublocalization of 11 expressed sequence tags within the refined region. *Oncogene.* 18:1635-8.
- Diatchenko, L., Y.F. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E.D. Sverdlov, and P.D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:6025-30.
- Dib, A., J. Adelaide, M. Chaffanet, A. Imbert, D. Le Paslier, J. Jacquemier, P. Gaudray, C. Theillet, D. Birnbaum, and M.J. Pebusque. 1995. Characterization of the region of the short arm of chromosome 8 amplified in breast carcinoma. *Oncogene.* 10:995-1001.

- Dickson, C., V. Fantl, C. Gillett, S. Brookes, J. Bartek, R. Smith, C. Fisher, D. Barnes, and G. Peters. 1995. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett.* 90:43-50.
- Dierick, H., and A. Bejsovec. 1999. Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol.* 43:153-90.
- Dodson, M.K., L.C. Hartmann, W.A. Cliby, K.A. DeLacey, G.L. Keeney, S.R. Ritland, J.Q. Su, K.C. Podratz, and R.B. Jenkins. 1993. Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 53:4456-60.
- Driouch, K., M. Briffod, I. Bieche, M.H. Champeme, and R. Lidereau. 1998. Location of several putative genes possibly involved in human breast cancer progression. *Cancer Res.* 58:2081-6.
- Driouch, K., M.H. Champeme, M. Beuzelin, I. Bieche, and R. Lidereau. 1997. Classical gene amplifications in human breast cancer are not associated with distant solid metastases. *Br J Cancer.* 76:784-7.
- Dunn, J.J., and F.W. Studier. 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol.* 166:477-535.
- Easton, D.F. 1994. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol.* 66:S177-82.
- Eccles, D.M., L. Brett, A. Lessells, L. Gruber, D. Lane, C.M. Steel, and R.C. Leonard. 1992. Overexpression of the p53 protein and allele loss at 17p13 in ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* 65:40-4.
- Eiriksdottir, G., G. Johannesdottir, S. Ingvarsson, I.B. Bjornsdottir, J.G. Jonasson, B.A. Agnarsson, J. Hallgrimsson, J. Gudmundsson, V. Egilsson, H. Sigurdsson, and R.B. Barkardottir. 1998. Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur J Cancer.* 34:2076-81.
- Eiriksdottir, G., A. Sigurdsson, J.G. Jonasson, B.A. Agnarsson, H. Sigurdsson, J. Gudmundsson, J.T. Bergthorsson, R.B. Barkardottir, V. Egilsson, and S. Ingvarsson. 1995. Loss of heterozygosity on chromosome 9 in human breast cancer: association with clinical variables and genetic changes at other chromosome regions. *Int J Cancer.* 64:378-82.
- Espanel, X., and M. Sudol. 2001. Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains. *J Biol Chem.* 276:14514-23.
- Evan, G.I., and K.H. Vousden. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 411:342-8.
- Fantl, V., M.A. Richards, R. Smith, G.A. Lammie, G. Johnstone, D. Allen, W. Gregory, G. Peters, C. Dickson, and D.M. Barnes. 1990. Gene amplification on chromosome band 11q13 and oestrogen receptor status in breast cancer. *Eur J Cancer.* 26:423-9.
- Feilotter, H.E., V. Coulon, J.L. McVeigh, A.H. Boag, F. Dorion-Bonnet, B. Duboue, W.C. Latham, C. Eng, L.M. Mulligan, and M. Longy. 1999. Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. *Br J Cancer.* 79:718-23.
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132:6-13.

- Fisher, R.A. (1973): Statistical Methods and Scientific Inference, 3rd Edn. Macmillan Hafner, New York, NY.
- Fonseca, R., L.C. Hartmann, I.A. Petersen, J.H. Donohue, T.B. Crotty, and J.J. Gisvold. 1997. Ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann Intern Med.* 127:1013-22.
- Forozan, F., R. Veldman, C.A. Ammerman, N.Z. Parsa, A. Kallioniemi, O.P. Kallioniemi, and S.P. Ethier. 1999. Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 81:1328-34.
- Frank, T.S., S.A. Manley, O.I. Olopade, S. Cummings, J.E. Garber, B. Bernhardt, K. Antman, D. Russo, M.E. Wood, L. Mullineau, C. Isaacs, B. Peshkin, S. Buys, V. Venne, P.T. Rowley, S. Loader, K. Offit, M. Robson, H. Hampel, D. Brener, E.P. Winer, S. Clark, B. Weber, L.C. Strong, A. Thomas, and et al. 1998. Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol.* 16:2417-25.
- Frohman, M.A., M.K. Dush, and G.R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:8998-9002.
- Fujino, T., J.I. Risinger, N.K. Collins, F.S. Liu, H. Nishii, H. Takahashi, E.M. Westphal, J.C. Barrett, H. Sasaki, M.F. Kohler, and et al. 1994. Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 54:4294-8.
- Futreal, P.A., Q. Liu, D. Shattuck-Eidens, C. Cochran, K. Harshman, S. Tavtigian, L.M. Bennett, A. Haugen-Strano, J. Swensen, Y. Miki, and et al. 1994. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science.* 266:120-2.
- Gabra, H., S.P. Langdon, J.E. Watson, R.A. Hawkins, B.B. Cohen, L. Taylor, J. Mackay, C.M. Steel, R.C. Leonard, and J.F. Smyth. 1995. Loss of heterozygosity at 11q22 correlates with low progesterone receptor content in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 1:945-53.
- Gabra, H., J.E. Watson, K.J. Taylor, J. Mackay, R.C. Leonard, C.M. Steel, D.J. Porteous, and J.F. Smyth. 1996. Definition and refinement of a region of loss of heterozygosity at 11q23.3-q24.3 in epithelial ovarian cancer associated with poor prognosis. *Cancer Res.* 56:950-4.
- Gale, M., Jr., C.M. Blakely, D.A. Hopkins, M.W. Melville, M. Wambach, P.R. Romano, and M.G. Katze. 1998. Regulation of interferon-induced protein kinase PKR: modulation of P58IPK inhibitory function by a novel protein, P52rIPK. *Mol Cell Biol.* 18:859-71.
- Gall, J.G., and M.L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 63:378-83.
- Gatti, R.A., A. Tward, and P. Concannon. 1999. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab.* 68:419-23.
- Gentile, M., K. Olsen, M. Dufmats, and S. Wingren. 1999. Frequent allelic losses at 11q24.1-q25 in young women with breast cancer: association with poor survival. *Br J Cancer.* 80:843-9.
- Goodstadt, L., and C.P. Ponting. 2001. CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics.* 17:845-6.

- Gruvberger, S., M. Ringner, Y. Chen, S. Panavally, L.H. Saal, A. Borg, M. Ferno, C. Peterson, and P.S. Meltzer. 2001. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* 61:5979-84.
- Gudas, L.J. 1994. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem.* 269:15399-402.
- Gudas, L.J.; Sporn, M.B.; Roberts, A.B. (1994): Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In Sporn, M.B.; Roberts, A.B. and Goodman, D.S. (eds): *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Raven Press, New York, pp. 443-520.
- Gudmundsson, J., R.B. Barkardottir, G. Eiriksdottir, T. Baldursson, A. Arason, V. Egilsson, and S. Ingvarsson. 1995. Loss of heterozygosity at chromosome 11 in breast cancer: association of prognostic factors with genetic alterations. *Br J Cancer.* 72:696-701.
- Guo, X., A. Ruiz, R.R. Rando, D. Bok, and L.J. Gudas. 2000. Esterification of all-trans-retinol in normal human epithelial cell strains and carcinoma lines from oral cavity, skin and breast: reduced expression of lecithin:retinol acyltransferase in carcinoma lines. *Carcinogenesis.* 21:1925-33.
- Hamann, J., C. Stortelers, E. Kiss-Toth, B. Vogel, W. Eichler, and R.A. van Lier. 1998. Characterization of the CD55 (DAF)-binding site on the seven-span transmembrane receptor CD97. *Eur J Immunol.* 28:1701-7.
- Hampl, M., J.A. Hampl, P. Schwarz, S. Frank, M. Hahn, G. Schackert, H. Saeger, and H.K. Schackert. 1999. Accumulation of Genetic Alterations in Brain Metastases of Sporadic Breast Carcinomas Is Associated with Reduced Survival after Metastasis. *Invasion Metastasis.* 18:81-95.
- Hampton, G.M., A. Mannermaa, R. Winqvist, M. Alavaikko, G. Blanco, P.J. Taskinen, H. Kiviniemi, I. Newsham, W.K. Cavenee, and G.A. Evans. 1994. Loss of heterozygosity in sporadic human breast carcinoma: a common region between 11q22 and 11q23.3. *Cancer Res.* 54:4586-9.
- Hansen, L.L., M. Yilmaz, J. Overgaard, J. Andersen, and T.A. Kruse. 1998. Allelic loss of 16q23.2-24.2 is an independent marker of good prognosis in primary breast cancer. *Cancer Res.* 58:2166-9.
- Hartkamp, J., J. Troppmair, and U.R. Rapp. 1999. The JNK/SAPK activator mixed lineage kinase 3 (MLK3) transforms NIH 3T3 cells in a MEK-dependent fashion. *Cancer Res.* 59:2195-202.
- Henry, J.A., C. Hennessy, D.L. Levett, T.W. Lennard, B.R. Westley, and F.E. May. 1993. int-2 amplification in breast cancer: association with decreased survival and relationship to amplification of c-erbB-2 and c-myc. *Int J Cancer.* 53:774-80.
- Hermanek, P., C. Wittekind, and H.J. Seib. 1997. [Current TNM aspects. 5. TNM classification and stage grouping]. *Zentralbl Chir.* 122:934-7.
- Hermsen, M.A., J.P. Baak, G.A. Meijer, J.M. Weiss, J.W. Walboomers, P.J. Snijders, and P.J. van Diest. 1998. Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. *J Pathol.* 186:356-62.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh, and R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 10:413-7.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 11:1026-30.

- Hirano, A., M. Emi, M. Tsuneizumi, Y. Utada, M. Yoshimoto, F. Kasumi, F. Akiyama, G. Sakamoto, S. Haga, T. Kajiwara, and Y. Nakamura. 2001. Allelic losses of loci at 3p25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3, and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 7:876-82.
- Hofmann, K. 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* 25:111-2.
- Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7276-80.
- Holtke, H.J., and C. Kessler. 1990. Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Res.* 18:5843-51.
- Huang, H., C.P. Reed, A. Mordi, G. Lomberg, L. Wang, V. Shridhar, L. Hartmann, R. Jenkins, and D.I. Smith. 1999. Frequent deletions within FRA7G at 7q31.2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 24:48-55.
- Hui, R., D.H. Campbell, C.S. Lee, K. McCaul, D.J. Horsfall, E.A. Musgrove, R.J. Daly, R. Seshadri, and R.L. Sutherland. 1997. EMS1 amplification can occur independently of CCND1 or INT-2 amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer. *Oncogene.* 15:1617-23.
- Huiping, C., G. Eiriksdottir, A. Sigurdsson, J.R. Sigurgeirsdottir, R.B. Barkardottir, V. Egilsson, and S. Ingvarsson. 1998. High frequency of LOH at chromosome 18q in human breast cancer: association with high S-phase fraction and low progesterone receptor content. *Anticancer Res.* 18:1031-6.
- Huiping, C., J.R. Sigurgeirsdottir, J.G. Jonasson, G. Eiriksdottir, J.T. Johannsdottir, V. Egilsson, and S. Ingvarsson. 1999. Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. *Br J Cancer.* 81:1103-10.
- Huminiecki, L., and R. Bicknell. 2000. In silico cloning of novel endothelial-specific genes. *Genome Res.* 10:1796-806.
- Hutchinson, J.N., and W.J. Muller. 2000. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene.* 19:6130-7.
- Iida, A., K. Kurose, R. Isobe, F. Akiyama, G. Sakamoto, M. Yoshimoto, F. Kasumi, Y. Nakamura, and M. Emi. 1998. Mapping of a new target region of allelic loss to a 2-cM interval at 22q13.1 in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 21:108-12.
- Inazuka, M., T. Tahira, and K. Hayashi. 1996. One-tube post-PCR fluorescent labeling of DNA fragments. *Genome Res.* 6:551-7.
- Iwabuchi, H., M. Sakamoto, H. Sakunaga, Y.Y. Ma, M.L. Carcangiu, D. Pinkel, T.L. Yang-Feng, and J.W. Gray. 1995. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.* 55:6172-80.
- Jagus, R., B. Joshi, and G.N. Barber. 1999. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:123-38.
- Janssens, V., and J. Goris. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 353:417-39.

- Jeanmougin, F., J.D. Thompson, M. Gouy, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* 23:403-5.
- John, H.A., M.L. Birnstiel, and K.W. Jones. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature.* 223:582-7.
- Kadowaki, T., E. Wilder, J. Klingensmith, K. Zachary, and N. Perrimon. 1996. The segment polarity gene *porcupine* encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev.* 10:3116-28.
- Kannan, K., J. Krishnamurthy, J. Feng, T. Nakajima, N. Tsuchida, and G. Shanmugam. 2000. Mutation profile of the p53, fh1t, p16INK4a/p19ARF and H-ras genes in Indian breast carcinomas. *Int J Oncol.* 17:1031-5.
- Karlseder, J., R. Zeillinger, C. Schneeberger, K. Czerwenka, P. Speiser, E. Kubista, D. Birnbaum, P. Gaudray, and C. Theillet. 1994. Patterns of DNA amplification at band q13 of chromosome 11 in human breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 9:42-8.
- Karnik, P., M. Paris, B.R. Williams, G. Casey, J. Crowe, and P. Chen. 1998. Two distinct tumor suppressor loci within chromosome 11p15 implicated in breast cancer progression and metastasis. *Hum Mol Genet.* 7:895-903.
- Kas, K., L. Michiels, and J. Merregaert. 1992. Genomic structure and expression of the human *fau* gene: encoding the ribosomal protein S30 fused to a ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 187:927-33.
- Kas, K., E. Schoenmakers, W. van de Ven, G. Weber, M. Nordenskjold, L. Michiels, J. Merregaert, and C. Larsson. 1993. Assignment of the human *FAU* gene to a subregion of chromosome 11q13. *Genomics.* 17:387-92.
- Kassavetis, G.A., E.T. Butler, D. Roulland, and M.J. Chamberlin. 1982. Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. II. Mapping of SP6 DNA and selective in vitro transcription. *J Biol Chem.* 257:5779-88.
- Kerr, J., J.A. Leary, T. Hurst, Y.C. Shih, T.M. Antalis, M. Friedlander, E. Crawford, S.K. Khoo, B. Ward, and G. Chenevix-Trench. 1996. Allelic loss on chromosome 7q in ovarian adenocarcinomas: two critical regions and a rearrangement of the *PLANH1* locus. *Oncogene.* 13:1815-8.
- Kihana, T., N. Yano, S. Murao, H. Iketani, K. Hamada, J. Yano, and S. Matsuura. 1996. Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients and less differentiated histology. *Jpn J Cancer Res.* 87:1184-90.
- Kirikoshi, H., N. Sagara, J. Koike, K. Tanaka, H. Sekihara, M. Hirai, and M. Katoh. 1999. Molecular cloning and characterization of human *Frizzled-4* on chromosome 11q14-q21. *Biochem Biophys Res Commun.* 264:955-61.
- Kittiniyom, K., K.M. Gorse, F. Dalbague, J.H. Lichy, J.K. Taubenberger, and I.F. Newsham. 2001. Allelic loss on chromosome band 18p11.3 occurs early and reveals heterogeneity in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 3:192-8.
- Knudson, A.G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68:820-3.
- Kollias, J., S. Man, M. Marafie, K. Carpenter, S. Pinder, I.O. Ellis, R.W. Blamey, G. Cross, and J.D. Brook. 2000. Loss of heterozygosity in bilateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 64:241-51.

- Komminoth, P. 1992. Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 1:142-50.
- Komminoth, P., F.B. Merk, I. Leav, H.J. Wolfe, and J. Roth. 1992. Comparison of 35S- and digoxigenin-labeled RNA and oligonucleotide probes for in situ hybridization. Expression of mRNA of the seminal vesicle secretion protein II and androgen receptor genes in the rat prostate. *Histochemistry.* 98:217-28.
- Koreth, J., C.J. Bakkenist, and J.O. McGee. 1997. Allelic deletions at chromosome 11q22-q23.1 and 11q25-qterm are frequent in sporadic breast but not colorectal cancers. *Oncogene.* 14:431-7.
- Krizman, D.B., R.F. Chuaqui, P.S. Meltzer, J.M. Trent, P.H. Duray, W.M. Linehan, L.A. Liotta, and M.R. Emmert-Buck. 1996. Construction of a representative cDNA library from prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* 56:5380-3.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E.L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305:567-80.
- Kumar, S., J.M. Vinci, B.A. Pytel, and C. Baglioni. 1993. Expression of messenger RNAs for complement inhibitors in human tissues and tumors. *Cancer Res.* 53:348-53.
- Kume, K., and T. Shimizu. 1997. cDNA cloning and expression of murine 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 237:663-6.
- Kupryjanczyk, J., A.D. Thor, R. Beauchamp, V. Merritt, S.M. Edgerton, D.A. Bell, and D.W. Yandell. 1993. p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4961-5.
- Kurose, K., K. Bando, K. Fukino, Y. Sugisaki, T. Araki, and M. Emi. 1998. Somatic mutations of the PTEN/MMAC1 gene in fifteen Japanese endometrial cancers: evidence for inactivation of both alleles. *Jpn J Cancer Res.* 89:842-8.
- Laake, K., V. Launonen, D. Niederacher, S. Gudlaugsdottir, S. Seitz, P. Rio, M.H. Champeme, I. Bieche, D. Birnbaum, G. White, M. Sztan, N. Sever, S. Plummer, A. Osorio, A. Broeks, P. Huusko, N. Spurr, A. Borg, A.M. Cleton-Jansen, L. van't Veer, J. Benitez, G. Casey, B. Peterlin, E. Olah, A.L. Borresen-Dale, and et al. 1999. Loss of heterozygosity at 11q23.1 and survival in breast cancer: results of a large European study. Breast Cancer Somatic Genetics Consortium. *Genes Chromosomes Cancer.* 25:212-21.
- Laake, K., A. Odegard, T.I. Andersen, I.K. Bukholm, R. Karesen, J.M. Nesland, L. Ottestad, Y. Shiloh, and A.L. Borresen-Dale. 1997. Loss of heterozygosity at 11q23.1 in breast carcinomas: indication for involvement of a gene distal and close to ATM. *Genes Chromosomes Cancer.* 18:175-80.
- Lai, C.H., C.Y. Chou, L.Y. Ch'ang, C.S. Liu, and W. Lin. 2000. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res.* 10:703-13.
- Lammie, G.A., V. Fantl, R. Smith, E. Schuurin, S. Brookes, R. Michalides, C. Dickson, A. Arnold, and G. Peters. 1991. D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene.* 6:439-44.

- Lardizabal, K.D., J.T. Mai, N.W. Wagner, A. Wyrick, T. Voelker, and D.J. Hawkins. 2001. DGAT2: A new diacylglycerol acyltransferase gene family: Purification, cloning and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J Biol Chem.* 31:31.
- Launonen, V., K. Laake, P. Huusko, D. Niederacher, M.W. Beckmann, R.B. Barkardottir, E.K. Geirsdottir, J. Gudmundsson, P. Rio, Y.J. Bignon, S. Seitz, S. Scherneck, I. Bieche, M.H. Champeme, D. Birnbaum, G. White, J. Varley, M. Sztan, E. Olah, A. Osorio, J. Benitez, N. Spurr, N. Velikonja, B. Peterlin, R. Winqvist, and et al. 1999. European multicenter study on LOH of APOC3 at 11q23 in 766 breast cancer patients: relation to clinical variables. *Breast Cancer Somatic Genetics Consortium. Br J Cancer.* 80:879-82.
- Launonen, V., F. Stenback, U. Puistola, R. Bloigu, P. Huusko, S. Kytola, A. Kauppila, and R. Winqvist. 1998. Chromosome 11q22.3-q25 LOH in ovarian cancer: association with a more aggressive disease course and involved subregions. *Gynecol Oncol.* 71:299-304.
- Lee, H.J., H. Sorimachi, S.Y. Jeong, S. Ishiura, and K. Suzuki. 1998. Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol Chem.* 379:175-83.
- Lee, T.G., N. Tang, S. Thompson, J. Miller, and M.G. Katze. 1994. The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol Cell Biol.* 14:2331-42.
- Leung, D.W. 2001. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci.* 6:D944-53.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88:323-31.
- Li, H., L.L. Zhao, J.W. Funder, and J.P. Liu. 1997. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 272:16729-32.
- Li, X., H.J. Yost, D.M. Virshup, and J.M. Seeling. 2001. Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *Embo J.* 20:4122-31.
- Liang, P., and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257:967-71.
- Liang, Y., T.R. Buckley, L. Tu, S.D. Langdon, and T.F. Tedder. 2001. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics.* 53:357-68.
- Lichy, J.H., M. Zavar, M.M. Tsai, T.J. O'Leary, and J.K. Taubenberger. 1998. Loss of heterozygosity on chromosome 11p15 during histological progression in microdissected ductal carcinoma of the breast. *Am J Pathol.* 153:271-8.
- Lidereau, R., R. Callahan, C. Dickson, G. Peters, C. Escot, and I.U. Ali. 1988. Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res.* 2:285-91.
- Lin, J.C., S.W. Scherer, L. Tougas, G. Traverso, L.C. Tsui, I.L. Andrulis, S. Jothy, and M. Park. 1996. Detailed deletion mapping with a refined physical map of 7q31 localizes a putative tumor suppressor gene for breast cancer in the region of MET. *Oncogene.* 13:2001-8.

- Link, C.J., Jr., E. Kohn, and E. Reed. 1996. The relationship between borderline ovarian tumors and epithelial ovarian carcinoma: epidemiologic, pathologic, and molecular aspects. *Gynecol Oncol.* 60:347-54.
- Linn, H., K.S. Ermekova, S. Rentschler, A.B. Sparks, B.K. Kay, and M. Sudol. 1997. Using molecular repertoires to identify high-affinity peptide ligands of the WW domain of human and mouse YAP. *Biol Chem.* 378:531-7.
- Liu, Y., M. Heyman, Y. Wang, U. Falkmer, C. Hising, L. Szekely, and S. Einhorn. 1994. Molecular analysis of the retinoblastoma gene in primary ovarian cancer cells. *Int J Cancer.* 58:663-7.
- Lopez, C.D., Y. Ao, L.H. Rohde, T.D. Perez, D.J. O'Connor, X. Lu, J.M. Ford, and L. Naumovski. 2000. Proapoptotic p53-interacting protein 53BP2 is induced by UV irradiation but suppressed by p53. *Mol Cell Biol.* 20:8018-25.
- Lounis, H., A.M. Mes-Masson, F. Dion, W.E. Bradley, R.J. Seymour, D. Provencher, and P.N. Tonin. 1998. Mapping of chromosome 3p deletions in human epithelial ovarian tumors. *Oncogene.* 17:2359-65.
- Lu, Y.J., P. Osin, S.R. Lakhani, S. Di Palma, B.A. Gusterson, and J.M. Shipley. 1998. Comparative genomic hybridization analysis of lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia and potential roles for gains and losses of genetic material in breast neoplasia. *Cancer Res.* 58:4721-7.
- Lynch, H.T., M.J. Casey, J. Lynch, T.E. White, and A.K. Godwin. 1998. Genetics and ovarian carcinoma. *Semin Oncol.* 25:265-80.
- Machotka, S.V., C.T. Garrett, A.M. Schwartz, and R. Callahan. 1989. Amplification of the proto-oncogenes int-2, c-erb B-2 and c-myc in human breast cancer. *Clin Chim Acta.* 184:207-17.
- Makino, R., H. Yazyu, Y. Kishimoto, T. Sekiya, and K. Hayashi. 1992. F-SSCP: fluorescence-based polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *PCR Methods Appl.* 2:10-3.
- Marsh, K.L., and J.M. Varley. 1998. Loss of heterozygosity at chromosome 9p in ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 77:1439-47.
- Matsumoto, S., F. Kasumi, G. Sakamoto, M. Onda, Y. Nakamura, and M. Emi. 1997. Detailed deletion mapping of chromosome arm 3p in breast cancers: a 2-cM region on 3p14.3-21.1 and a 5-cM region on 3p24.3-25.1 commonly deleted in tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 20:268-74.
- McCright, B., A.R. Brothman, and D.M. Virshup. 1996. Assignment of human protein phosphatase 2A regulatory subunit genes b56alpha, b56beta, b56gamma, b56delta, and b56epsilon (PPP2R5A-PPP2R5E), highly expressed in muscle and brain, to chromosome regions 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1, and 7p11.2 --> p12. *Genomics.* 36:168-70.
- Meyers, S.L., M.T. O'Brien, T. Smith, and J.P. Dudley. 1990. Analysis of the int-1, int-2, c-myc, and neu oncogenes in human breast carcinomas. *Cancer Res.* 50:5911-8.
- Michiels, L., E. Van der Rauwelaert, F. Van Hasselt, K. Kas, and J. Merregaert. 1993. fau cDNA encodes a ubiquitin-like-S30 fusion protein and is expressed as an antisense sequence in the Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus. *Oncogene.* 8:2537-46.

- Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P.A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L.M. Bennett, W. Ding, and et al. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266:66-71.
- Minobe, K., M. Onda, A. Iida, F. Kasumi, G. Sakamoto, Y. Nakamura, and M. Emi. 1998. Allelic loss on chromosome 9q is associated with lymph node metastasis of primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res*. 89:916-22.
- Moasser, M.M., M. Srethapakdi, K.S. Sachar, A.J. Kraker, and N. Rosen. 1999. Inhibition of Src kinases by a selective tyrosine kinase inhibitor causes mitotic arrest. *Cancer Res*. 59:6145-52.
- Mogensen, O. 1992. Prognostic value of CA 125 in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 44:207-12.
- Moinfar, F., Y.G. Man, L. Arnould, G.L. Bratthauer, M. Ratschek, and F.A. Tavassoli. 2000. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res*. 60:2562-6.
- Monaco, C., M. Helmer Citterich, E. Caprini, I. Vorechovsky, G. Russo, C.M. Croce, G. Barbanti-Brodano, and M. Negrini. 1998. Molecular cloning and characterization of ZNF202: a new gene at 11q23.3 encoding testis-specific zinc finger proteins. *Genomics*. 52:358-62.
- Monaco, C., M. Negrini, G. Sozzi, M.L. Veronese, I. Vorechovsky, A.K. Godwin, and C.M. Croce. 1997. Molecular cloning and characterization of LOH11CR2A, a new gene within a refined minimal region of LOH at 11q23. *Genomics*. 46:217-22.
- Monni, O., M. Barlund, S. Mousses, J. Kononen, G. Sauter, M. Heiskanen, P. Paavola, K. Avela, Y. Chen, M.L. Bittner, and A. Kallioniemi. 2001. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:5711-6.
- Nagase, S., S. Sato, F. Tezuka, Y. Wada, A. Yajima, and A. Horii. 1996. Deletion mapping on chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Br J Cancer*. 74:1979-83.
- Nagl, U.O., M. Erdel, F. Bergmann, B. Oehl, E. Scandella, L. Musante, L.J. Galletta, M. Gschwentner, J. Furst, A. Schmarda, S. Hofer, G. Utermann, P. Deetjen, and M. Paulmichl. 1998. Characterization of the human gene coding for the swelling-dependent chloride channel ICln at position 11q13.5-14.1 (CLNS1A) and further characterization of the chromosome 6 (CLNS1B) localization. *Gene*. 209:59-63.
- Nagl, U.O., M. Erdel, A. Schmarda, M. Seri, G.M. Pinggera, M. Gschwentner, C. Duba, L.J. Galletta, P. Deetjen, G. Utermann, and M. Paulmichl. 1996. Chromosomal localization of the genes (CLNS1A and CLNS1B) coding for the swelling-dependent chloride channel ICln. *Genomics*. 38:438-41.
- Naumovski, L., and M.L. Cleary. 1996. The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol*. 16:3884-92.
- Negrini, M., D. Rasio, G.M. Hampton, S. Sabbioni, S. Rattan, S.L. Carter, A.L. Rosenberg, G.F. Schwartz, Y. Shiloh, W.K. Cavenee, and et al. 1995. Definition and refinement of chromosome 11 regions of loss of heterozygosity in breast cancer: identification of a new region at 11q23.3. *Cancer Res*. 55:3003-7.

- Newman, B., M.A. Austin, M. Lee, and M.C. King. 1988. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:3044-8.
- Noviello, C., F. Courjal, and C. Theillet. 1996. Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6 in breast cancer: possibly four regions of deletion. *Clin Cancer Res.* 2:1601-6.
- Obata, K., and H. Hoshiai. 2000. Common genetic changes between endometriosis and ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 50:39-43.
- O'Connell, P., V. Pekkel, S.A. Fuqua, C.K. Osborne, G.M. Clark, and D.C. Allred. 1998. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst.* 90:697-703.
- Oettgen, P., M. Barcinski, J. Boltax, P. Stolt, Y. Akbarali, and T.A. Libermann. 1999. Genomic organization of the human ELF3 (ESE-1/ESX) gene, a member of the Ets transcription factor family, and identification of a functional promoter. *Genomics.* 55:358-62.
- Ohara, O., R.L. Dorit, and W. Gilbert. 1989. One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:5673-7.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya, and K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5:874-9.
- Paterson, M.C., K.D. Dietrich, J. Danyluk, A.H. Paterson, A.W. Lees, N. Jamil, J. Hanson, H. Jenkins, B.E. Krause, W.A. McBlain, and et al. 1991. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 51:556-67.
- Pathak, D.R., J.R. Osuch, and J. He. 2000. Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. *Cancer.* 88:1230-8.
- Perelman, B., N. Dafni, T. Naiman, D. Eli, M. Yaakov, T.L. Feng, S. Sinha, G. Weber, S. Khodaei, A. Sancar, I. Dotan, and D. Canaani. 1997. Molecular cloning of a novel human gene encoding a 63-kDa protein and its sublocalization within the 11q13 locus. *Genomics.* 41:397-405.
- Perou, C.M., T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, and D. Botstein. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406:747-52.
- Phelan, C.M., A. Borg, M. Cuny, D.N. Crichton, T. Baldersson, T.I. Andersen, M.A. Caligo, R. Lidereau, A. Lindblom, S. Seitz, D. Kelsell, U. Hamann, P. Rio, S. Thorlacius, J. Papp, E. Olah, B. Ponder, Y.J. Bignon, S. Scherneck, R. Barkardottir, A.L. Borresen-Dale, J. Eyfjord, C. Theillet, A.M. Thompson, C. Larsson, and et al. 1998. Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters. *Cancer Res.* 58:1004-12.

- Pimkhaokham, A., Y. Shimada, Y. Fukuda, N. Kurihara, I. Imoto, Z.Q. Yang, M. Imamura, Y. Nakamura, T. Amagasa, and J. Inazawa. 2000. Nonrandom chromosomal imbalances in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: possible involvement of the ATF3 and CENPF genes in the 1q32 amplicon. *Jpn J Cancer Res.* 91:1126-33.
- Plummer, S.J., M.J. Paris, J. Myles, R. Tubbs, J. Crowe, and G. Casey. 1997. Four regions of allelic imbalance on 17q12-qter associated with high-grade breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 20:354-62.
- Ponder, B.A. 2001. Cancer genetics. *Nature.* 411:336-41.
- Pozzi, A., P.E. Moberg, L.A. Miles, S. Wagner, P. Soloway, and H.A. Gardner. 2000. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2202-7.
- Prigent, C., R. Gill, M. Trower, and P. Sanseau. 1999. In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to Drosophila Aurora using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol.* 1:123-8.
- Radford, D.M., K.L. Fair, N.J. Phillips, J.H. Ritter, T. Steinbrueck, M.S. Holt, and H. Donis-Keller. 1995. Allelotyping of ductal carcinoma in situ of the breast: deletion of loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q. *Cancer Res.* 55:3399-405.
- Ragnarsson, G., G. Eiriksdottir, J.T. Johannsdottir, J.G. Jonasson, V. Egilsson, and S. Ingvarsson. 1999. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br J Cancer.* 79:1468-74.
- Rebbeck, T.R., A.K. Godwin, and K.H. Buetow. 1996. Variability in loss of constitutional heterozygosity across loci and among individuals: association with candidate genes in ductal breast carcinoma. *Mol Carcinog.* 17:117-25.
- Riemenschneider, M.J., R. Buschges, M. Wolter, J. Reifemberger, J. Bostrom, J.A. Kraus, U. Schlegel, and G. Reifemberger. 1999. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res.* 59:6091-6.
- Roux-Dosseto, M., S. Romain, N. Dussault, C. Desideri, L. Piana, P. Bonnier, N. Tubiana, and P.M. Martin. 1992. c-myc gene amplification in selected node-negative breast cancer patients correlates with high rate of early relapse. *Eur J Cancer.* 28A:1600-4.
- Roy, W.J., Jr., R.H. Watson, A. Hitchcock, and I.G. Campbell. 1997. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 7 and 9 in benign epithelial ovarian tumours. *Oncogene.* 15:2031-5.
- Ruediger, R., H.T. Pham, and G. Walter. 2001. Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A alpha subunit gene. *Oncogene.* 20:10-5.
- Runnebaum, I.B., M. Nagarajan, M. Bowman, D. Soto, and S. Sukumar. 1991. Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10657-61.
- Sagara, N., H. Kirikoshi, H. Terasaki, Y. Yasuhiko, G. Toda, K. Shiokawa, and M. Katoh. 2001. FZD4S, a splicing variant of frizzled-4, encodes a soluble-type positive regulator of the WNT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 282:750-6.

- Sager, R. 1997. Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:952-5.
- Sager, R., S. Sheng, A. Anisowicz, G. Sotiropoulou, Z. Zou, G. Stenman, K. Swisshelm, Z. Chen, M.J. Hendrix, P. Pemberton, and et al. 1994. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 59:537-46.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-91.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Sanseau, P. 2001. Impact of human genome sequencing for in silico target discovery. *Drug Discov Today*. 6:316-323.
- Saretzki, G., U. Hoffmann, P. Rohlke, R. Psille, T. Gaigal, G. Keller, H. Hofler, T. Loning, I. Petersen, and M. Dietel. 1997. Identification of allelic losses in benign, borderline, and invasive epithelial ovarian tumors and correlation with clinical outcome. *Cancer*. 80:1241-9.
- Sato, K., and S. Kawashima. 2001. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem*. 382:743-51.
- Savinova, O., B. Joshi, and R. Jagus. 1999. Abnormal levels and minimal activity of the dsRNA-activated protein kinase, PKR, in breast carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 31:175-89.
- Scheurle, D., M.P. DeYoung, D.M. Binniger, H. Page, M. Jahanzeb, and R. Narayanan. 2000. Cancer gene discovery using digital differential display. *Cancer Res*. 60:4037-43.
- Schmitt, A.O., T. Specht, G. Beckmann, E. Dahl, C.P. Pilarsky, B. Hinzmann, and A. Rosenthal. 1999. Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. *Nucleic Acids Res*. 27:4251-60.
- Schmitt, J.F., B.J. Susil, and M.T. Hearn. 1996. Aberrant FGF-2, FGF-3, FGF-4 and C-erb-B2 gene copy number in human ovarian, breast and endometrial tumours. *Growth Factors*. 13:19-35.
- Schmutzler, R.K., E. Bierhoff, T. Werkhausen, R. Fimmers, P. Speiser, E. Kubista, D. Krebs, R. Zeillinger, O.D. Wiestler, and A. Von Deimling. 1997. Genomic deletions in the BRCA1, BRCA2 and TP53 regions associate with low expression of the estrogen receptor in sporadic breast carcinoma. *Int J Cancer*. 74:322-5.
- Schmutzler, R.K., R. Fimmers, E. Bierhoff, B. Lohmar, A. Homann, P. Speiser, E. Kubista, K. Jaeger, D. Krebs, R. Zeillinger, O.D. Wiestler, and A. Von Deimling. 1996. Association of allelic losses on human chromosomal arms 11Q and 16Q in sporadic breast cancer. *Int J Cancer*. 69:307-11.
- Schuler, G.D. 1998. Electronic PCR: bridging the gap between genome mapping and genome sequencing. *Trends Biotechnol*. 16:456-9.
- Schutze, K., H. Posl, and G. Lahr. 1998. Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 44:735-46.

- Schuuring, E. 1995. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes--a review. *Gene*. 159:83-96.
- Schuuring, E., E. Verhoeven, H. van Tinteren, J.L. Peterse, B. Nunnink, F.B. Thunnissen, P. Devilee, C.J. Cornelisse, M.J. van de Vijver, W.J. Mooi, and et al. 1992. Amplification of genes within the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer Res*. 52:5229-34.
- Schwartz, R.S., A.C. Rybicki, and R.L. Nagel. 1997. Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pICln in human young red blood cells: association with actin. *Biochem J*. 327:609-16.
- Seeling, J.M., J.R. Miller, R. Gil, R.T. Moon, R. White, and D.M. Virshup. 1999. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*. 283:2089-91.
- Seraj, M.J., R.S. Samant, M.F. Verderame, and D.R. Welch. 2000. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res*. 60:2764-9.
- Seshadri, R., C.S. Lee, R. Hui, K. McCaul, D.J. Horsfall, and R.L. Sutherland. 1996. Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis. *Clin Cancer Res*. 2:1177-84.
- Shen, C.Y., J.C. Yu, Y.L. Lo, C.H. Kuo, C.T. Yue, Y.S. Jou, C.S. Huang, J.C. Lung, and C.W. Wu. 2000. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res*. 60:3884-92.
- Sheng, Z.M., A. Marchetti, F. Buttitta, M.H. Champeme, D. Campani, M. Bistocchi, R. Lidereau, and R. Callahan. 1996. Multiple regions of chromosome 6q affected by loss of heterozygosity in primary human breast carcinomas. *Br J Cancer*. 73:144-7.
- Simpson, K.L., A. Jones, S. Norman, and C.H. Holmes. 1997. Expression of the complement regulatory proteins decay accelerating factor (DAF, CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) and CD59 in the normal human uterine cervix and in premalignant and malignant cervical disease. *Am J Pathol*. 151:1455-67.
- Sirivatanauskorn, Y., R. Drury, T. Crnogorac-Jurcevic, V. Sirivatanauskorn, and N.R. Lemoine. 1999. Laser-assisted microdissection: applications in molecular pathology. *J Pathol*. 189:150-4.
- Slamon, D.J., W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, and et al. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 244:707-12.
- Sonoda, G., J. Palazzo, S. du Manoir, A.K. Godwin, M. Feder, M. Yakushiji, and J.R. Testa. 1997. Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 20:320-8.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, and K. Suzuki. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*. 328:721-32.

- Sudol, M. 1994. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene*. 9:2145-52.
- Sudol, M., P. Bork, A. Einbond, K. Kastury, T. Druck, M. Negrini, K. Huebner, and D. Lehman. 1995. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem*. 270:14733-41.
- Suzuki, A., S. Fukushige, S. Nagase, N. Ohuchi, S. Satomi, and A. Horii. 1997. Frequent gains on chromosome arms 1q and/or 8q in human endometrial cancer. *Hum Genet*. 100:629-36.
- Suzuki, M., S. Saito, Y. Saga, M. Ohwada, and I. Sato. 1998. Loss of heterozygosity on chromosome 6q27 and p53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Med Oncol*. 15:119-23.
- Szepetowski, P., A. Courseaux, G.F. Carle, C. Theillet, and P. Gaudray. 1992a. Amplification of 11q13 DNA sequences in human breast cancer: D11S97 identifies a region tightly linked to BCL1 which can be amplified separately. *Oncogene*. 7:751-5.
- Szepetowski, P., V. Ollendorff, J. Grosgeorge, A. Courseaux, D. Birnbaum, C. Theillet, and P. Gaudray. 1992b. DNA amplification at 11q13.5-q14 in human breast cancer. *Oncogene*. 7:2513-7.
- Tang, R.P., B. Kacinski, P. Validire, F. Beuvon, X. Sastre, P. Benoit, A. dela Rochefordiere, V. Mosseri, P. Pouillart, and S. Scholl. 1990. Oncogene amplification correlates with dense lymphocyte infiltration in human breast cancers: a role for hematopoietic growth factor release by tumor cells? *J Cell Biochem*. 44:189-98.
- Tanigami, A., T. Tokino, K. Takita, M. Ueda, F. Kasumi, and Y. Nakamura. 1992. Detailed analysis of an amplified region at chromosome 11q13 in malignant tumors. *Genomics*. 13:21-4.
- Tanner, M.M., M. Tirkkonen, A. Kallioniemi, J. Isola, T. Kuukasjarvi, C. Collins, D. Kowbel, X.Y. Guan, J. Trent, J.W. Gray, P. Meltzer, and O.P. Kallioniemi. 1996. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res*. 56:3441-5.
- Tapper, J., R. Butzow, T. Wahlstrom, M. Seppala, and S. Knuutila. 1997. Evidence for divergence of DNA copy number changes in serous, mucinous and endometrioid ovarian carcinomas. *Br J Cancer*. 75:1782-7.
- Tavassoli, M., H. Steingrimsdottir, E. Pierce, X. Jiang, M. Alagoz, F. Farzaneh, and I.G. Campbell. 1996. Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and identifies a tumour suppressor gene locus at 5q13.1-21. *Br J Cancer*. 74:115-9.
- Theillet, C., J. Adnane, P. Szepetowski, M.P. Simon, P. Jeanteur, D. Birnbaum, and P. Gaudray. 1990. BCL-1 participates in the 11q13 amplification found in breast cancer. *Oncogene*. 5:147-9.

- Thorsteinsson, L., G.M. O'Dowd, P.M. Harrington, and P.M. Johnson. 1998. The complement regulatory proteins CD46 and CD59, but not CD55, are highly expressed by glandular epithelium of human breast and colorectal tumour tissues. *Apmis*. 106:869-78.
- Tirkkonen, M., M. Tanner, R. Karhu, A. Kallioniemi, J. Isola, and O.P. Kallioniemi. 1998. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. 21:177-84.
- Torma, H., and A. Vahlquist. 1990. Vitamin A esterification in human epidermis: a relation to keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol*. 94:132-8.
- Tritz, D., M. Pieretti, S. Turner, and D. Powell. 1997. Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol*. 28:607-12.
- Tsuda, H., S. Hirohashi, Y. Shimosato, T. Hirota, S. Tsugane, H. Yamamoto, N. Miyajima, K. Toyoshima, T. Yamamoto, J. Yokota, and et al. 1989. Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res*. 49:3104-8.
- Tsukamoto, K., N. Ito, M. Yoshimoto, F. Kasumi, F. Akiyama, G. Sakamoto, Y. Nakamura, and M. Emi. 1998. Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer*. 82:317-22.
- Tymms, M.J., A.Y. Ng, R.S. Thomas, B.C. Schutte, J. Zhou, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, A. Seth, M. Rosenberg, T. Papas, C. Debouck, and I. Kola. 1997. A novel epithelial-expressed ETS gene, ELF3: human and murine cDNA sequences, murine genomic organization, human mapping to 1q32.2 and expression in tissues and cancer. *Oncogene*. 15:2449-62.
- Valgardsdottir, R., L. Tryggvadottir, M. Steinarsdottir, K. Olafsdottir, S. Jonasdottir, J.G. Jonasson, H.M. Ogmundsdottir, and J.E. Eyfjord. 1997. Genomic instability and poor prognosis associated with abnormal TP53 in breast carcinomas. Molecular and immunohistochemical analysis. *Apmis*. 105:121-30.
- Vingron, M., and J. Hoheisel. 1999. Computational aspects of expression data. *J Mol Med*. 77:3-7.
- Wang, S.S., E.D. Esplin, J.L. Li, L. Huang, A. Gazdar, J. Minna, and G.A. Evans. 1998. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science*. 282:284-7.
- Wang, T.C., R.D. Cardiff, L. Zukerberg, E. Lees, A. Arnold, and E.V. Schmidt. 1994. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*. 369:669-71.
- Watson, M.A., and T.P. Fleming. 1996. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 56:860-5.
- Watson, P.H., J.R. Safneck, K. Le, D. Dubik, and R.P. Shiu. 1993. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 85:902-7.
- Watson, R.H., P.J. Neville, W.J. Roy, Jr., A. Hitchcock, and I.G. Campbell. 1998. Loss of heterozygosity on chromosomes 7p, 7q, 9p and 11q is an early event in ovarian tumorigenesis. *Oncogene*. 17:207-12.

- Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Sci Am.* 275:62-70.
- Weitzel, J.N., J. Patel, D.M. Smith, A. Goodman, H. Safaii, and H.G. Ball. 1994. Molecular genetic changes associated with ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 55:245-52.
- West, M., C. Blanchette, H. Dressman, E. Huang, S. Ishida, R. Spang, H. Zuzan, J.A. Olson, Jr., J.R. Marks, and J.R. Nevins. 2001. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11462-7.
- Wick, W., I. Petersen, R.K. Schmutzler, B. Wolfarth, D. Lenartz, E. Bierhoff, J. Hummerich, D.J. Muller, A.P. Stangl, J. Schramm, O.D. Wiestler, and A. von Deimling. 1996. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene.* 12:973-8.
- Williams, B.R. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 18:6112-20.
- Winqvist, R., G.M. Hampton, A. Mannermaa, G. Blanco, M. Alavaikko, H. Kiviniemi, P.J. Taskinen, G.A. Evans, F.A. Wright, I. Newsham, and et al. 1995. Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis. *Cancer Res.* 55:2660-4.
- Wittenberger, T., H.C. Schaller, and S. Hellebrand. 2001. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol.* 307:799-813.
- Wooster, R., S.L. Neuhausen, J. Mangion, Y. Quirk, D. Ford, N. Collins, K. Nguyen, S. Seal, T. Tran, D. Averill, and et al. 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* 265:2088-90.
- Wright, K., P.J. Wilson, J. Kerr, K. Do, T. Hurst, S.K. Khoo, B. Ward, and G. Chenevix-Trench. 1998. Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene.* 17:1185-8.
- Wu, R., D.C. Connolly, X. Ren, E.R. Fearon, and K.R. Cho. 1999. Somatic mutations of the PPP2R1B candidate tumor suppressor gene at chromosome 11q23 are infrequent in ovarian carcinomas. *Neoplasia.* 1:311-4.
- Yagi, R., L.F. Chen, K. Shigesada, Y. Murakami, and Y. Ito. 1999. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *Embo J.* 18:2551-62.
- Yang, L.M., U.C. Tin, K. Wu, and P. Brown. 1999. Role of retinoid receptors in the prevention and treatment of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 4:377-88.
- Yokota, T., S. Matsumoto, M. Yoshimoto, F. Kasumi, F. Akiyama, G. Sakamoto, Y. Nakamura, and M. Emi. 1997. Mapping of a breast cancer tumor suppressor gene locus to a 4-cM interval on chromosome 18q21. *Jpn J Cancer Res.* 88:959-64.
- Yoshikawa, Y., H. Mukai, F. Hino, K. Asada, and I. Kato. 2000. Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res.* 91:459-63.
- Yu, A., C. Zhao, Y. Fan, W. Jang, A.J. Mungall, P. Deloukas, A. Olsen, N.A. Doggett, N. Ghebranious, K.W. Broman, and J.L. Weber. 2001. Comparison of human genetic and sequence-based physical maps. *Nature.* 409:951-3.

- Zhang, L., W. Zhou, V.E. Velculescu, S.E. Kern, R.H. Hruban, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1997. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*. 276:1268-72.
- Zhang, M., K.J. Martin, S. Sheng, and R. Sager. 1998. Expression genetics: a different approach to cancer diagnosis and prognosis. *Trends Biotechnol.* 16:66-71.
- Zhuang, Z., M.J. Merino, R. Chuaqui, L.A. Liotta, and M.R. Emmert-Buck. 1995. Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. *Cancer Res.* 55:467-71.

G Anhang

G.1 Häufig verwendete Lösungen und Reagenzien

DNA-Gelladepuffer, 6x:	0,25% (w/v) Bromphenolblau BPB (low) 0,25% (w/v) Xylen-Cyanol (high) 30% (v/v) Glycerin 60mM EDTA in H ₂ O bidest
GCS-Lösung:	100g Guadinium-Isothiocyanat (Serva, Heidelberg) 124,8ml H ₂ O bidest 7ml Natriumcitrat ,0,75M, pH7,0 3ml Natrium-Lauroylsarkosin (Serva, Heidelberg) lösen bei 65°C und abkühlen lassen.
Hybridisierungslösung: (ISH)	50% Formamid (low conductivity) 0,75M NaCl 1x PE (10mM PIPES pH 6.8, 1mM EDTA pH 8.0) 0,1mg/ml tRNA 0,05% Heparin 0,1% BSA 1% SDS in H ₂ O bidest (DNase/RNase frei)
LB-Medium:	1% (w/v) Bacto-Tryptone 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl mit 1M NaOH auf pH 7,5 einstellen
Maleinsäure Puffer:	0,1M Maleinsäure 0,15M NaCl in 1L in H ₂ O , pH 7,5 mit 10N NaOH einstellen
Mops-Puffer, 10x:	200 mM 3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit 10M NaOH auf pH 7.0 einstellen, lichtgeschützt
PBS-Puffer, 10x:	11,5g Na ₂ HPO ₄ 2g KH ₂ PO ₄ 80g NaCl 2g KCl in 1L H ₂ O bidest

SOC-Medium:	20g/L Bacto-Trypton 5g/L Hefeextrakt 0,5g/L NaCl 0,186g/L KCl 10mM MgCl ₂
SSC, 20x:	87,7g NaCl 44,1g Natriumcitrat in 500ml H ₂ O bidest mit HCl auf pH 7,2 einstellen
TBE-Puffer, 10x:	0,89M Tris-Base 0,89M Borsäure 0,02M EDTA (pH 8,3)
TBS-Puffer, 10x:	80g NaCl 2g KCl, 25ml 1M Tris-HCl in 1L H ₂ O bidest, pH7,4
TE-Puffer, 1x:	50mM Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA

G.2 Weitere Informationen zu den Referenzen und zu den Kandidatengenomen in 11q12-q23

Tab. 25: Referenzangaben zu Tab.1 (Kap.A.2.4) und zu Tab.19 (Kap.C.4).

Nr.	Referenz	Nr.	Referenz
1	Karlseder et al. 1994	25	Tanigami et al. 1992
2	Szepetowski et al. 1992.A	26	Carter et al. 1994
3	Barbareschi et al. 1997	27	Gudmundsson et al. 1995
4	Fantl et al. 1990	28	Hampton et al. 1994
5	Schuuring et al. 1992	29	Koreth et al. 1997
6	Seshadri et al. 1996	30	Shen et al. 2000
7	Szepetowski et al. 1992.B	31	Negrini et al. 1995
8	Theillet et al. 1990	32	Schmutzler et al. 1996
9	Berns et al. 1992	33	Laake et al. 1997
10	Champeme et al. 1995	34	Laake et al. 1999
11	Driouch et al. 1997	35	Hampl et al. 19999
12	Hui et al. 1997	36	di lasio et al. 1999
13	Borg et al. 1991	37	Rebbeck et al. 1996
14	Lammie et al. 1991	38	Launonen et al. 1999
15	Paterson et al. 1991	39	Windqvist et al. 1995
16	Tsuda et al. 1989	40	Schmitt et al. 1996
17	Adnane et al. 1989	41	Weitzel et al.1994
18	Henry et al. 1993	42	Gabra et al.1995
19	Lidereau et al. 1988	43	Gabra et al. 1996
20	Machotka et al. 1989	44	Wu et al. 1999
21	Meyers et al. 1990	45	Launonen et al.1998
22	Roux-Dosseto et al. 1992	46	Saretzki et al. 1997
23	Schmitt et al. 1996	47	Davis et al.1996
24	Tang et al. 1990		

Tab. 26: Weitere Angaben zu in-silico Kandidatengenen und STS-Markern aus LOH- und Amplifikationsstudien. Name der Gene und Marker mit geläufigen Abkürzungen, Genbankeintrag des ESTs repräsentierend für das Assembly, Genbankeintrag der BAC-Sequenz auf dem das Gen bzw. der Marker lokalisiert ist und Ergebnisse des elektronischen Northern einschließlich des P-Wertes.

Nr.	Gen / STS-Marker	Gen / STS-Marker	Assembly ID	BAC ID	e-Northern in Brustgewebe			
					Hits N	Hits T	Ratio T/N	P-Wert
1	Lipophilin B	LPHB	gi4107230	AC074200	14	24	2,86	0.00212
2	Mammaglobin 1	MGB1	gi1199595	AC074200	51	98	3,13	6.43e-12
3	Desmoyokin	AHNAK	gi819017	AP001363	60	15	0,45	0.00364
4	Transcobalamin 1	TCN1	gi307478	AC021809	1	6	11,11	0.0104
5	CD 20 like precursor	LOC64166	gi1012431	AP001257	14	1	0,12	0.0138
6	Lipophilin A	LPHA	gi4107228	AC021454	0	4	n.d.	0.0203
7	Nuclear RNA export factor 1	NXF1	gi616703	AC015703	18	3	0,30	0.0411
8	Solute carrier family 3, member 2	SLC3A2	gi182864	AP000438	4	14	6,25	0.000354
9	Retinoic acid receptor responder 3	RARRES3	gi1332058	AP002337	10	21	3,70	0.00048
10	Cytochrome c oxidase subunit VIII	COX 8	gi691455	AC023920	2	7	6,25	0.013
11	FLJ22711	FLJ22711	gi2060804	AC005848	1	6	11,11	0.0104
12	Fau	Fau	gi690466	AC051660	4	11	5,00	0.00483
13	Heat shock protein 90	HSP90	gi728277	AP000769	232	102	0,72	0.00662
14	Alpha gene sequence	alpha	gi1342157	AP000769	105	35	0,60	0.00794
15	Protein kinase MLK-3	MLK-3	gi464027	AP000803	1	6	11,11	0.0104
16	Non-muscle type cofilin 1	CFL1	gi1692050	AC009470	9	19	3,70	0.000648
17	FLJ21749	FLJ21749	gi917650	AC005849	0	5	n.d.	0.00595
18	FLJ20853	FLJ20853	gi659758	AC005849	1	5	9,09	0.025
19	Glutathione S-transferase pi 1	GSTP1	gi6552334	AC021987	-	-	-	-
20	Deleted in oral cancer-related 1	DOC-1R	gi1396893	AC021987	3	9	5,26	0.0116
21	Aldehyde dehydrogenase 8	ALDH8	gi1578881	AC021987	5	14	5,00	0.00111
22	D11S97	D11S97	gi36374	AC019124	-	-	-	-
23	Cyclin D1 (PRAD1)	CCND1	gi717688	AP001888	-	-	-	-
24	CCND1 / FGF3	CCND1 / FGF3			-	-	-	-
25	Fibroblast growth factor 4	FGF4 (HST1)	gi186785	AP001888	-	-	-	-
26	FGF4 / FGF3	FGF4 / FGF3			-	-	-	-
27	Fibroblast growth factor 3	FGF3 (INT-2)	gi4885232	AP000850	-	-	-	-
28	Fibroblast growth factor 3	FGF3 (INT-2)			-	-	-	-
29	Amplaxin	EMS1	gi182086	AP000405	-	-	-	-
30	Protein phosphatase methylesterase-1	PME-1	gi661684	AC006595	1	5	9,09	0.025
31	ELBT	ELBT	gi722841	AC021221	24	3	0,22	0.00772
32	Death associated protein 4	DAP4	gi9886758	AC022183	10	0	n.d.	0.017
33	GARP	GARP	gi439295	AP001189	-	-	-	-
34	Chloride channel regulatory protein 1A	CLNS1A	gi26528	AP000609	18	22	2,17	0.0197
35	D11S901	D11S901	gi23036	AC019134	-	-	-	-
36	Unbekannt	unbekannt	gi562404	AP000446	0	3	n.d.	0.0462
37	Clathrin assembly protein	CLTH	gi560235	AC055755	25	4	0,29	0.0115
38	Frizzled 4	FZD4	gi6912383	AP001528	14	1	0,12	0.0138
39	D11S4175	D11S4175	gi1232530	AP001875	-	-	-	-
40	D11S1342	D11S1342	gi394374	AP000651	-	-	-	-
41	D11S873	D11S873	gi484167	AP000722	-	-	-	-
42	D11S29	D11S29	gi484158	AP001154	-	-	-	-
43	Hypothetical protein HSPC148	HSPC148	gi986447	AP001152	0	3	n.d.	0.0462
44	D11S35	D11S35	gi30382	AP001533	-	-	-	-
45	D11S940	D11S940	gi23830	AP000776	-	-	-	-
46	Yes-associated protein	YAP65	gi395507	AC009765	26	6	0,41	0.0437
47	Matrix metalloproteinase 7	MMP7	gi35802	AC067795	18	3	0,30	0.0411
48	D11S2000	D11S2000	gi939413	AC016517	-	-	-	-
49	D11S1325	D11S1325	gi394028	AP000641	-	-	-	-
50	D11S1778	D11S1778	gi1232912	AC012383	-	-	-	-
51	D11S1294	D11S1294	gi308720	AP000871	-	-	-	-
52	D11S927	D11S927	gi23633	AP000901	-	-	-	-
53	D11S1391	D11S1391	gi939425	AC027539	-	-	-	-
54	D11S1347	D11S1347	gi394564	AC010815	-	-	-	-
55	D11S897	D11S897	gi488112	AP000802	-	-	-	-
56	D11S528	D11S528	gi30386	AP000774	-	-	-	-
57	Apolipoprotein C-III	APOC3	gi13641496	AP001480	-	-	-	-
58	D11S976	D11S976	kein Eintrag	AP000665	-	-	-	-
59	CD3D antigen	CD3D	gi11440313	AP002792	-	-	-	-
60	D11S925	D11S925	gi23602	AP001929	-	-	-	-

G.3 Referenzen zu Aberrationsstudien bei gynäkologischen Tumoren in Bezug auf das gesamte Genom

Tab. 27: Auswahl an Referenzen für Aberrationen (LOH, Amplifikation) in Brusttumoren mit Angabe von Kandidatengenen und Assoziationen bestimmter Aberrationen zur Histologie und Progression der Tumore. Referenzen dienen als Grundlage des Progressionsmodells (Kapitel A.2.1, Abb.2) und zur Gegenüberstellung von Aberrationsdaten mit den 330 kartierten in-silico Kandidatengenen (Kapitel C.2, Abb.11.1/2).

Brusttumor			
LOH	Kandidatengene	Histologie und Progression	Literatur
1p32-p36	p73	-	Ragnarsson et al., 1999; Bieche et al., 1999; Tsukamoto et al., 1998
1p22-p31	-	Tumorgroße, Metastasierung	Ragnarsson et al., 1999; Tsukamoto et al., 1998
3p22-p25	-	höheres Rezidivrisiko	Hirano et al., 2001; Matsumoto et al., 1997
3p14	FHIT	höheres Rezidivrisiko; PR-negativ	Driouch et al., 1998; Matsumoto et al., 1997
4q12-q13	-	höheres Grading	Burger et al. 1998
6q24-q27	-	höheres Grading, PR-negativ	Noviello et al., 1996; Sheng et al., 1996
7q31	MET	schlechte Prognose	Bieche et al., 1997; Lin et al., 1996
8p12-p22	-	höheres Rezidivrisiko	Hirano et al., 2001, Dahiya et al., 1998
9p21-p22	CDKN2/p16	DCIS	Marsh et al., 1998; Eiriksdottir et al., 1995
9q22/ 9q33	-	Metastasierung	Minobe et al. 1998
10q23	PTEN	ER-negativ; schlechte Prognose	Bose et al., 1998; Feilolter et al., 1999
11p15	TSG101	schlechte Prognose	Karnik et al., Lichy et al., 1999
11q22-qter	ATM	höheres Grading, schlechte Prognose	Gentile et al., 1999; Driouch et al., 1998
13q12-q14	Rb, BRCA2	höheres Rezidivrisiko, ER-negativ	Eiriksdottir et al., 1998; Schmutzler et al., 1997
15q	-	Metastasierung	Driouch et al., 1998; Wick et al., 1996
16q22-q23	E-Cadherin	ILC, Fernmetastasen	Huiping et al., 1999 ; Driouch et al., 1998
16q23-q24	-	DCIS, bessere Prognose	Hansen et al., 1998; Chen et al., 1996
17p13.1-p13.3	TP53	höheres Rezidivrisiko, ER-negativ	Hirano et al., 2001; Schmutzler et al., 1997
17q21-q24	BRCA1	höheres Grading, ER-negativ	Phelan et al., 1998; Plummer et al., 1997
18q21-q22	DCC	PR-negativ	Huiping et al., 1998; Yokota et al., 1997
22q13	NF2	höheres Rezidivrisiko	Hirano et al., 2001; Iida et al., 1998
Amplifikation	Kandidatengene	Histologie und Progression	Literatur
1q31-q32	ELF3, MDM	-	Tirkkonen et al., 1998 ; Benitez et al., 1997
8p11-p12	FGFR1	ILC, ER-positiv	Courjal et al., 1997; Dib et al., 1995
8q24	MYC	IDC, ER-negativ, schlechte Prognose	Hermesen et al., 1998; Courjal et al., 1997
11q13	CCND1, FGF3	ILC, ER-positiv, schlechte Prognose	Hermesen et al., 1998; Courjal et al., 1997
12q13-q15	MDM2	-	Aubele et al., 1999; Bueso-Ramos et al., 1996
17q11-q12	ERBB2/ HER-2	IDC, ER-negativ; schlechte Prognose	Hermesen et al., 1998; Courjal et al., 1997
20q13	-	schlechte Prognose	Hermesen et al., 1998; Tanner et al., 1996

Tab. 28: Auswahl an Referenzen für Aberrationen (LOH, Amplifikation) in Ovarialtumoren und endometrialen Tumoren mit Angabe von Kandidatengenen und Assoziationen bestimmter Aberrationen zur Histologie und Progression der Tumore. Referenzen dienen als Grundlage des Progressionsmodells (Kapitel A.2.2, Abb.3) und zur Gegenüberstellung von Aberrationsdaten mit den 330 kartierten in-silico Kandidatengenen (Kapitel C.2, Abb.11.1/2).

Ovarialtumor			
LOH	Kandidatengene	Histologie und Progression	Literatur
1p36	-	-	Ragnarsson et al., 1999
2q21-q22	-	-	Saretzki et al., 1997; Cliby et al., 1993
3p14	FHIT	niedriges Grading	Lounis et al., 1998; Arnold et al., 1996
5q21-q22	APC	niedriges Grading	Saretzki et al., 1997; Tavassoli et al., 1996
6p	-	niedriges Grading	Link et al., 1996; Weitzel et al., 1994
6q22-q27	-	-	Suzuki et al., 1998; Colitti et al., 1998
7q21-q31	-	-	Huang et al., 1999; Kerr et al.1996
8p12-p23	-	-	Wright et al, 1998
9p21-pter	CDKN2, p16	niedriges Grading	Saretzki et al., 1997; Campbell et al., 1995
10q23	PTEN	-	Obata et al., 2000
11p15	HRAS	höheres Grading	Link et al., 1996; Weitzel et al., 1994
11q22-qter	ATM	niedriges Grading	Launonen et al., 1998; Davis et al., 1996
13q	RB	höheres Grading	Liu et al., 1994 ; Dodson et al., 1993
15q	-	höheres Grading	Link et al., 1996
17p11-p13	TP53	niederes Grading	Watson et al., 1996; Eccles et al., 1992
17q21-q24	BRCA1	höheres Grading	Saretzki et al., 1997; Eccles et al., 1992
18q21-q22	DCC	höheres Grading	Saretzki et al., 1997; Arnold et al., 1996
22q	NF2	-	Bryan et al., 1996; Link et al., 1996
Amplifikation			
Amplifikation	Kandidatengen	Histologie und Progression	Literatur
1q32	-	-	Tapper et al., 1997; Sonoda et al., 1997
3q26.3-qter	PIK3CA	höheres Grading	Sonoda et al., 1997; Arnold et al., 1996; Iwabuchi et al., 1995
8q23-qter	MYC	höheres Grading	Sonoda et al., 1997; Arnold et al., 1996
12p	KRAS	niedriges Grading	Sonoda et al., 1997; Arnold et al., 1996
17q11-q12	ERBB2/ HER-2	niedriges Grading	Lynch et al., 1998
19q	-	-	Lynch et al., 1998; Sonoda et al., 1997
20q	MYBL2	höheres Grading	Arnold et al., 1996; Iwabuchi et al., 1995
Endometrium-Tumor			
LOH	Kandidatengene	Histologie und Progression	Literatur
1p	-	-	Ragnarsson et al. 1999
7q11.23	-	-	Fujino et al. 1994
10q23-q26	-	-	Kurose et al. 1998; Nagase et al. 1996
16q	E-Cadherin	-	Kihana et al, 1996
17p, 17q	-	Östrogen-unabhängig	Tritz et al., 1997
Amplifikation			
Amplifikation	Kandidatengen	Histologie und Progression	Literatur
1q	-	-	Suzuki et al, 1997
8q	-	-	Suzuki et al, 1998

G.4 Nukleinsäure- und Proteinsequenz von ELBT

gccgcggctgccgcctctgctggggtctaggctgtttctctcgccaccactggccgcc	60
ggccgcagctccaggtgtcttagccgccagccttcgacgccgtccggggacccctgtgc	120
tctgcgcgaagccctggccccggggccggggcatggccagggcgccgggtgaagcgg	180
cttcccgcggggccgtgactgggcgggcttcagccatgaagaccctcatagccgcctact	240
M --K--T--L--I--A--A--Y--S	9
ccggggctctgcgcggcgagcgtcagggcgaggctgaccggagccagcgtctcacggag	300
--G--V--L--R--G--E--R--Q--A--E--A--D--R--S--Q--R--S--H--G--G	29
gacctgcgtgtcgccgcgggggtctgggagatggggcactggatccagcatcctctccg	360
--P--A--L--S--R--E--G--S--G--R--W--G--T--G--S--S--I--L--S--A	49
ccctccaggacctcttctctgtcacctggctcaataggtccaaggtgaaaagcagctac	420
--L--Q--D--L--F--S--V--T--W--L--N--R--S--K--V--E--K--Q--L--Q	69
aggtcatctcagtgctccagtggttctgtcttcttctgtactggagtgccctgcagtg	480
--V--I--S--V--L--Q--W--V--L--S--F--L--V--L--G--V--A--C--S--A	89
ccatcctcatgtacatatctgtcactgattgctggctcatcgctgtgctctacttactt	540
--I--L--M--Y--I--F--C--T--D--C--W--L--I--A--V--L--Y--F--T--W	109
ggctggtgtttgactggaacacacccaagaaaggtggcaggaggtcacagtgggtccgaa	600
--L--V--F--D--W--N--T--P--K--K--G--G--R--R--S--Q--W--V--R--N	129
actgggtgtgtggcgtactttcgagactactttcccatccagtggtgaagacacaca	660
--W--A--V--W--R--Y--F--R--D--Y--F--P--I--Q--L--V--K--T--H--N	149
acctgctgaccaccaggaactatctttggataccaccccatggtatcatgggcctgg	720
--L--L--T--T--R--N--Y--I--F--G--Y--H--P--H--G--I--M--G--L--G	169
gtgccttctgcaacttcagcacagaggccacagaagtgaagaagtcccaggcatac	780
--A--F--C--N--F--S--T--E--A--T--E--V--S--K--K--F--P--G--I--R	189
ggccttacctgggtacactggcaggcaacttccgaatgcctgtgttgaggagtagctga	840
--P--Y--L--A--T--L--A--G--N--F--R--M--P--V--L--R--E--Y--L--M	209
tgtctggaggtatctgcctgtcagccgggacaccatagactatttgccttcaaagaatg	900
--S--G--G--I--C--P--V--S--R--D--T--I--D--Y--L--L--S--K--N--G	229
ggagtggaatgctatcatcatcgtgggtcgggggtgcggctgagtcctctgagctccatgc	960
--S--G--N--A--I--I--I--V--V--G--G--A--A--E--S--L--S--S--M--P	249
ctggcaagaatgcagtcacccctgcggaaccgcaagggctttgtgaaactggccctgcgtc	1020
--G--K--N--A--V--T--L--R--N--R--K--G--F--V--K--L--A--L--R--H	269
atggagctgacctgggttcccatctactcctttggagagaatgaagtgtacaagcagggtga	1080
--G--A--D--L--V--P--I--Y--S--F--G--E--N--E--V--Y--K--Q--V--I	289
tcttcgaggagggtcctcctggggccgatgggtccagaagaagtccagaatatcatgggt	1140
--F--E--E--G--S--W--G--R--W--V--Q--K--K--F--Q--K--Y--I--G--F	309
tcgccccatgcacttccatggtcgaggcctcttctcctccgacacctgggggtggtgc	1200
--A--P--C--I--F--H--G--R--G--L--F--S--S--D--T--W--G--L--V--P	329
cctactccaagcccatcaccactgttggtgggagagcccatcaccatccccaaagctggagc	1260
--Y--S--K--P--I--T--T--V--V--G--E--P--I--T--I--P--K--L--E--H	349
acccaacccagcaagacatgcacctgtaccacacatgtacatggaggccctggtgaagc	1320
--P--T--Q--Q--D--I--D--L--Y--H--T--M--Y--M--E--A--L--V--K--L	369
tcttcgacaagcacaagaccaagttcggcctccggagactgaggtcctggaggtgaact	1380
--F--D--K--H--K--T--K--F--G--L--P--E--T--E--V--L--E--V--N--*	388
g agccagccttcggggccaattccctggagggaaccagctgcaaatcactttttgctctg	1440
taaatttggaagtgtcatgggtgtctgtgggttatttaaaagaaattataacaattttgc	1500
taaaccattacaatgttaggtcttttttaagaaggaaaaagtcagtatttcaagttcttt	1560
cacttccagcttgcctgttcttaggtggtggctaaatctgggcctaatctgggtggctca	1620
gctaacctctcttcttcccttctgaagtgacaaaggaaactcagttcttggggaaga	1680
aggattgccattagtgacttggaccagtttagatgattcactttttgccctagggtgag	1740
aggcgaaagccacttctcatacaagcccccttattgccactacccacgctcgtctagtc	1800
ctgaaactgcaggaccagtttctctgccaaagggaggagttggagagcacagttgccccg	1860
ttgtgtgagggcagtagtaggcacatctggaatgctccagtttgatctccttctgccccc	1920
ctacctcaccctagtcactcatatcgagcctggactggcctccaggatgaggtgggg	1980
gtggcaatgacacctgcaggggaaaggactgcccccatgcaccattgcagggaggatg	2040
ccgccaccatgagctaggtggagtaactggtttttcttgggtggctgatgacatggatgc	2100
agcacagactcagccttggcctggagcacatgcttactggtggcctcagtttacctccc	2160
cagatcctagattctggatgtgaggaagagatccctcttcagaaggggcctggcctctg	2220
agcagcagattagttccaaagcaggtggccccgaacccaagcctcacttttctgtgcct	2280
tcttgaggggttggggccggggaggaaacccaacctctcctgtgtgttctgtatctct	2340
tgatgagatcattgcaccatgtcagacttttgtatgtccttgaaaataaatgaaagtga	2400
gaatcctc	2408

G.5 Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin / Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin / Glutaminsäure

Abkürzungen

AKT2	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
AUTEX	Automatic Extension of partial DNA Sequences
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Beq	Bequerel
Bp	Basenpaare
BRCA	Breast Cancer
CA125	Cancer Antigen 125
CCND1	Cyclin D1
CDNA	Komplementäre DANN
CDH1	Cadherin 1
CDKN2A (p16)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CGAP	Cancer Gene Anatomy Projekt
CGH	Comparative Genome Hybridization
DCIS	Duktales Karzinom in situ
DDD	Digital Differential Display
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELF3	E74-Like Factor 3
EPCR	elektronische PCR
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2 (HER-2/NEU)	Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
EST	Expressed Sequence Tag
FGF3 (4)	Fibroblast Growth Factor 3 (4)
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FHIT	Fragile Histidine Triad Gene
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	Genome Assembly Program
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GARP	Glycoprotein A Repetitions Predominant
H	Stunde(n)
HSC70	Heat Shock Cognate 70
HTGS	High-Throughput Genomic Sequencing
HUGO	Human Genome Projekt
IDC	Invasiv duktales Karzinom
ILC	Invasiv lobuläres Karzinom
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactosid
Kb	Kilobasen
KRAS	Kirsten-Ras-Onkogene-Associated Gene
LCIS	lobuläres Karzinom in situ

LOH	Loss Of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
MDM2	Mouse Double Minute 2
MEM	Minimum Essential Medium
MEN1	Multiple Endocrine Neoplasie Typ 1
Min	Minute(n)
MMLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
MRNA	messenger RNA
MTN	Multiple Tissue Northern
MYC	Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
N	Normalgewebe
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PBL	Periphere Blut-Leukozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RH	Radiation Hybrid
PR	Progesteronrezeptor
R6G	Carboxy-Rhodamin 6G
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription / Transkriptase
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde(n)
SSC	Natriumzitat-Puffer
SSCP	Single-Strand Conformational Polymorphism
STS	Sequence Tagged Site
T	Tumorgewebe
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TP53	Tumor Protein 53
TSG	Tumorsuppressorgen(e)
UICC	International Union Against Cancer
UNG	Uracil-N-glycosylase
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside
ZNF202	Zinc Finger Protein 202

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1998 bis Dezember 2001 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. André Rosenthal und Herrn Dr. Edgar Dahl bei der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH in Berlin angefertigt. Ich danke Ihnen für die umfassende Unterstützung, Betreuung und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Börner an der Fakultät für Biologie danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung an der Humboldt-Universität zu Berlin und für die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dürst an der Friedrich Schiller Universität in Jena danke ich für die Begutachtung der Arbeit. Herzlichen Dank an Frau PD Dr. Rosemarie Lichtner und Herrn Dr. Edgar Dahl für die vorhergehende Korrekturlesung der Arbeit.

Ich danke allen Wissenschaftlern in der Firma metaGen für ihre Unterstützung, insbesondere Dr. Bernd Hinzmann für die persönlichen "Genomsitzungen", Dr. Birgit Weber für die Hilfe bei der Mutationsanalyse, Dr. Thomas Specht, Dr. Armin Schmitt und Dr. Olaf Lange für die Problemlösungen in der Bioinformatik sowie Dr. Christian Pilarsky, Dr. Andreas Rump, Dr. Detlev Mennerich und Dr. Irina Klamann für die große Hilfe in Methodik und Strategie dieser Arbeit.

Besonderen Dank an Beate Petschke, Nicole Creutzburg, Annette Buß und Rolf Schwarzer für die Unterstützung und die gute Stimmung im Labor. Vielen Dank an meine Mitstreiter Christoph Wissmann, Simone Kaiser, Eike Staub, Stefan Röpcke, Eva Klopocki, Grit Kasper und Marina Himmelfarb für die Anregungen und Abwechslungen während dieser Arbeit.

Dr. Glen Christiansen an dem Universitätsklinikum Charité in Berlin danke ich für die Bereitstellung der Gewebeproben für diese Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Bea für die große Unterstützung während der gesamten Zeit, für die Korrekturlesungen der Arbeit und dass wir uns in dieser Zeit trotz der Entfernung Stuttgart-Berlin so nah waren.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

Lebenslauf

Name: Ruprecht Kuner

Geburtstag: 07.01.1969

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: Verheiratet

1975-1979 Mozart Grundschule, Neuhausen

1979-1989 Heinrich-Heine Gymnasium, Ostfildern

April 1989 Abitur

1989-1990 Grundwehrdienst in Landsberg/Lech

1991-1996 Biologiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Jan 96 Diplomprüfung (Humangenetik, Parasitologie, Humanphysiologie)

1996-1997 Diplomarbeit in der Abteilung Klinische Genetik in Tübingen bei Prof. Dr. Kaiser (Molekulargenetische Untersuchungen des Silver-Russell-Syndroms auf uniparentale Disomie 7)

1997-1998 Wissenschaftliche Arbeit an der Abteilung Medizinische Virologie in Tübingen bei Dr. Klaus Hamprecht (Epidemiologische Aspekte bei der Übertragung des Cytomegalievirus über die Muttermilch auf das Neugeborene)

Apr 98 Beginn der Promotionsarbeit in der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH bei Prof. Dr. A. Rosenthal (Identifizierung differenziell exprimierter Gene bei Brust- und Ovarialkarzinomen in den chromosomalen Regionen 1q32-q41 und 11q12-q23)
Erstgutachter der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. T. Börner

Publikationsliste

- Eggermann, T., H.A. Wollmann, **R. Kuner**, K. Eggermann, H. Enders, P. Kaiser, and M.B. Ranke. 1997. Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum Genet.* 100:415-9.
- Eggermann, T., K. Eggermann, S. Mergenthaler, **R. Kuner**, P. Kaiser, M.B. Ranke, and H.A. Wollmann. 1998. Paternally inherited deletion of CSH1 in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 35:784-6.
- Prix, L., **R. Kuner**, C.P. Speer, G. Jahn, and K. Hamprecht. 1998. Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of the UL10-UL13 genomic region for rapid identification of human cytomegalovirus strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17:525-8.